

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005247

International filing date: 23 March 2005 (23.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-176107
Filing date: 14 June 2004 (14.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 6月14日

出願番号
Application Number: 特願2004-176107

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

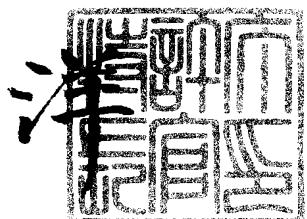
出願人
Applicant(s): 久光製薬株式会社
千葉県

J P 2004-176107

2005年 4月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 1082
【提出日】 平成16年 6月14日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61P 25/00
A61P 35/00

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 666-2 千葉県がんセンター内
【氏名】 中川原 章

【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区仁戸名町 666-2 千葉県がんセンター内
【氏名】 尾崎 俊文

【特許出願人】
【識別番号】 000160522
【氏名又は名称】 久光製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100088155
【弁理士】
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】
【識別番号】 100128381
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 義憲
【電話番号】 03-3564-8001
【連絡先】 担当

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004-93266
【出願日】 平成16年 3月26日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014708
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0203410

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

p 7 3 と IKK- α との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 2】

被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p 7 3 及び IKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、
培養したそれぞれの細胞における、p 7 3 と IKK- α との相互作用を測定する測定工程と、

被検化合物の存在下において培養した細胞における p 7 3 と IKK- α との相互作用が、
被検化合物の非存在下において培養した細胞における p 7 3 と IKK- α との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、
を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 3】

p 7 3 と IKK- α との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 4】

被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p 7 3 及び IKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、
培養したそれぞれの細胞における、p 7 3 と IKK- α との相互作用を測定する測定工程と、

被検化合物の存在下において培養した細胞における p 7 3 と IKK- α との相互作用が、
被検化合物の非存在下において培養した細胞における p 7 3 と IKK- α との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、
を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 5】

配列番号 24 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス促進剤。

【請求項 6】

配列番号 24 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス促進剤。

【請求項 7】

配列番号 25 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤。

【請求項 8】

配列番号 25 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤。

【請求項 9】

配列番号 26 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤。

【請求項 10】

配列番号 26 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】アポトーシスを促進又は抑制する化合物をスクリーニングする方法、アポトーシス促進剤及びアポトーシス抑制剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、アポトーシスを促進又は抑制する化合物をスクリーニングする方法、アポトーシス促進剤及びアポトーシス抑制剤に関する。

【背景技術】

【0002】

アポトーシス促進性のp53やそのホモログであるp73とは対照的に、NF- κ Bシグナル伝達経路は、DNA損傷のような様々なアポトーシス促進性の刺激に対する細胞保護において重要な役割を演じている。通常の条件下では、NF- κ Bはp50サブユニット及びp65(Re1A)サブユニットから構成されるヘテロダイマー複合体として存在しており、I κ B- α やI κ B- β などの抑制性タンパク質との相互作用により、転写的に不活性の状態にある。I κ BはNF- κ Bの核移行シグナルをマスクしており、それによりNF- κ Bの核移行を妨げている。

【0003】

ある刺激があると、NF- κ Bシグナル伝達経路の上流のレギュレーターであるI κ Bキナーゼ(IKK)複合体は、I κ BのN末端のシグナル応答ドメインにある特定のセリン残基を急速にリン酸化し、I κ Bはプロテアソーム依存的にポリユビキチン化されて分解される。その結果、I κ BにマスクされていたNF- κ Bの核移行シグナルが露出され、NF- κ Bは核に移行し活性化される。IKK複合体は、2つの触媒サブユニットであるIKK- α (IKK-1とも呼ばれる)及びIKK- β (IKK-2とも呼ばれる)、並びに足場機能を有する1つの調節サブユニットであるIKK- γ (NEMOとも呼ばれる)から構成される。

【0004】

NF- κ Bとp53又はp73との関係については、以下のようなことが知られている。一次抗原刺激に応答して、NF- κ Bは、T細胞におけるアポトーシス促進性のp73のアップレギュレーションを制限し、T細胞の生存を促進するが、NF- κ Bの活性化がp73の発現を阻害している正確な分子の基盤は分かっていない(非特許文献1)。抗癌剤であるドキソルビシンに応答して、IKK- α ではなくIKK- β がNF- κ Bを活性化し、それによって、タンパク質レベルのp53の蓄積が阻害される(非特許文献2)。これらの結果は、NF- κ Bの活性化はp53、p73又はその双方により介するアポトーシスを抑制するかもしれないということを示唆している。また、これと一致して、p53とNF- κ Bとの間に双方向性の抑制が存在することが示されている(非特許文献3)。

【0005】

対照的に、NF- κ Bはp53の補因子として働き、p53依存性のアポトーシスに必要であるということが報告されている(非特許文献4)。さらに、p53はNF- κ Bの直接の転写標的であることや、p53活性化シグナルはNF- κ Bの活性化の阻害により部分的にブロックされることが示されている(非特許文献5~7)。

【0006】

Uボックス型ユビキチンプロテインリガーゼファミリーのメンバーであるUFD2a(ubiquitin fusion degradation protein-2a)は、最初にE4ユビキチン化因子として同定された。UFD2aはポリユビチキン鎖の伸長を触媒して、ポリユビキチン化された基質タンパク質をプロテアソームによる分解の標的とさせる(非特許文献8及び9)。Uボックスの予想三次元構造は、RINGフィンガーのそれに似ており、UFD2aはE3ユビキチンプロテインリガーゼとしても作用する(非特許文献9)。最近、ヒトUFD2a遺伝子が、神経芽細胞腫及び他の癌の候補腫瘍抑制遺伝子の遺伝子座である1p36.2-p36.3に位置づけられることが示された(非特許文献10)。しかしながら、本発明者らが変異

解析を行ったところ、神経芽細胞腫及び神経芽細胞腫由来株化細胞において UFD2a 遺伝子はめったに変異を起こさないことが示唆された。また、酵母においては、Ufd2 はストレス条件下での細胞生存に関係している（非特許文献8）。アポトーシス刺激により、UFD2a はカスパーゼ6 又はグランザイムB によって切断され、その酵素活性は顕著に損なわれる（非特許文献11）。

【0007】

【非特許文献1】 Wan, Y. Y. et al., The survival of antigen-stimulated T cells requires NF κ B-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 18: 331-342 (2003).

【非特許文献2】 Tergaonkar, V. et al., p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 1: 493-503 (2002).

【非特許文献3】 Webster, G. A. et al., Transcriptional crosstalk between NF- κ B and p53. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3485-3495 (1999).

【非特許文献4】 Ryan, K. M. et al., Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404: 892-897 (2000).

【非特許文献5】 Wu, H. et al., NF- κ B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J. Biol. Chem.* 269: 20067-20074 (1994).

【非特許文献6】 Sun, X. et al., Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4489-4496 (1995).

【非特許文献7】 Hellin, A. C. et al., Nuclear factor- κ B-dependent regulation of p53 gene expression induced by daunomycin genotoxic drug. *Oncogene* 16: 1187-1195 (1998).

【非特許文献8】 Kogl, M. et al., *Cell* 96:635-644 (1999).

【非特許文献9】 Hatakeyama, H. et al., *J. Biol. Chem.* 276: 33111-33120 (2001).

【非特許文献10】 Ohira, M. et al., *Oncogene* 19: 4302-4307 (2000).

【非特許文献11】 Mahoney, J. A. et al., *Biochem. J.* 351: 587-595 (2002).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、NF- κ B シグナル伝達経路と、p53、p73 又はその双方によって仲介されるアポトーシスとの間のあり得る関係の機能的な重要性については、いまだに確立されていない。p73 のアポトーシス誘導活性をそのメカニズムを含めて明らかにし、それを増強又は抑制する化合物を見出すことは、癌又は神経変性疾患の治療・予防薬の開発につながる。

【0009】

したがって、本発明は、p73 の活性化の分子メカニズムを解明することを目的の一つとした。そして、そのメカニズムから導き出されたアポトーシスを促進又は抑制する化合物のスクリーニング方法を提供することも目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、シスプラチニン処理により、p73 及び p53 の誘導と関連して IKK- α が核内で顕著に蓄積することを見出した。また、IKK- α を発現させると、ユビキチン化を阻害することにより p73 の半減期は上昇し、それによって、トランス活性化及びアポトーシス促進活性が増強することを見出した。さらに、免疫沈降及び免疫染色の実験から、p73 は IKK- α と直接会合しており、核マトリックスにおいて両者は共存していることを見出した。以上の知見等から、本発明者らは、IKK- α は p73 と直接相互

作用することにより p73 を安定化し、p73 が誘導するアポトーシスを促進するという分子メカニズムを明らかにし、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、p73 と IKK- α との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、p73 と IKK- α とが直接相互作用するという分子メカニズムを応用したものである。かかる分子メカニズムは本発明者らが新たに見出したものであり、したがって、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物を本スクリーニング方法により得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス促進剤や抗癌剤として応用することが可能である。

【0012】

本発明は、また、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73 及び IKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞの細胞における、p73 と IKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞における p73 と IKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞における p73 と IKK- α との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程と、を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法により、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物を得ることが可能であり、また、かかる化合物は、アポトーシス促進剤や抗癌剤として応用することが可能である。

【0013】

本発明は、また、p73 と IKK- α との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、p73 と IKK- α とが直接相互作用するという分子メカニズムを応用したものである。かかる分子メカニズムは本発明者らが新たに見出したものであり、したがって、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物を本スクリーニング方法により得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス抑制剤や神経変性疾患の治療薬として応用することが可能である。

【0014】

本発明は、また、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73 及び IKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞの細胞における、p73 と IKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞における p73 と IKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞における p73 と IKK- α との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、を備える、アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法により、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物を得ることが可能である。かかる化合物は、アポトーシス抑制剤や神経変性疾患の治療薬として応用することが可能である。

【0015】

本発明は、また、配列番号 24 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス促進剤及び配列番号 24 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス促進剤を提供する。配列番号 24 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- α タンパク質である。上述したように、本発明者らは、IKK- α は p73 と直接相互作用することにより p73 を安定化し、p73 が誘導するアポトーシスを促進するという分子メカニズムを明らかにした。このような分子メカニズムは、抗アポトーシス性の経路である NF- κ B シグナル伝達経路における IKK- α の役割からは、全く予想に反する。すなわち、p73 が仲介するアポトーシスにおいて、IKK- α は、抗アポトーシス的な役割ではなく、アポトーシス促進的な役割を演じていることになる。したがって、IKK- α タンパク質やタンパク質をコードする核酸は、アポトーシス促進剤として用いることが可能である。

【0016】

本発明は、また、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤及び配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤を提供する。配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- α の44番目のリジン残基がアラニン残基に置換されたIKK- α (K44A)タンパク質である。本発明者らは、IKK- α (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。すなわち、p73が仲介するアポトーシスにおいて、IKK- α (K44A)は、抗アポトーシス的に機能し、したがって、IKK- α (K44A)タンパク質やタンパク質をコードする核酸は、アポトーシス抑制剤として用いることが可能である。

【0017】

本発明は、さらに、配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなるアポトーシス抑制剤及び配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなるアポトーシス抑制剤を提供する。配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、UFD2aタンパク質である。本発明者らは、UFD2aがp73を分解することにより、p73のアポトーシス活性を低下させることを明らかにした。すなわち、p73が仲介するアポトーシスにおいて、UFD2aは抗アポトーシス的に機能する。したがって、UFD2aタンパク質やそれをコードする核酸は、アポトーシス抑制剤として用いることが可能である。

【発明の効果】

【0018】

本発明のスクリーニング方法によれば、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物及び抗アポトーシス性化合物を得ることが可能である。このような化合物を見出すことで、癌又は神経変性疾患の治療・予防に有効な薬を開発することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0020】

(アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法)

本発明のアポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法は、p73とIKK- α との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物が得られる。

【0021】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、酵母ツーハイブリッド法やPCA法(プロテイン・フラグメント・コンプリメンテーション・アッセイ)が挙げられる。酵母ツーハイブリッド法及びPCA法の概要を以下に説明する。

【0022】

まず、酵母ツーハイブリッド法を説明する。酵母Gα14は、N末端側のDNA結合ドメイン(DBD)とC末端側の転写活性化ドメイン(AD)とからなる転写制御因子である。両ドメインは基本的には自律的に機能し、DBDは単独でDNAに結合できるが転写の活性化は起こせない。ADはその反対である。この性質を応用して開発されたのが酵母ツーハイブリッド法である。つまり、Gα14のDBDに目的のタンパク質Pを融合したタンパク質(ベイト)と、Gα14のADに別のタンパク質Qを融合したタンパク質(プレイ)を酵母細胞に導入した場合、PとQとが核内で相互作用すれば、酵母細胞内で転写制御複合体が再構成され、Gα14結合部位依存的に転写が活性化されることになる。この活性をレポーター遺伝子を用いて検出することにより、タンパク質P及びQの間の相互

作用が容易に評価できる。レポーター遺伝子としては、例えば、HIS3、lacZ、URA3などを利用することができる。また、酵母Gα14以外にも、SRFやLexAを用いた系も利用することが可能である。

【0023】

酵母ツーハイブリッド法において、タンパク質Pとしてp73を、タンパク質QとしてIKK- α を用いた系（又はその逆の系でも構わない）によれば、本発明のスクリーニング方法を行うことが可能である。すなわち、ペイトとしてp73又はIKK- α の一方を、プレイとしてp73又はIKK- α の他方を酵母に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該酵母を培養し、培養した酵母のレポーター遺伝子の転写活性（p73とIKK- α との相互作用の強さを表す）を測定し、被検化合物存在下の転写活性が被検化合物非存在下の転写活性よりも上昇している場合、被検化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

【0024】

次に、PCA法について説明する。PCA法では、一つの機能タンパク質A（酵素、転写因子など）を二つの断片A1及びA2に分割し、それぞれを目的タンパク質P及びQと融合し、融合タンパク質A1-P及びA2-Qを作製する。目的タンパク質P及びQが結合すると、機能タンパク質Aの機能が回復し、その活性を検出することで、P及びQの相互作用を判定する、という原理に基づいている。機能タンパク質としては、例えば β -ラクタマーゼを利用することができる。以下では、 β -ラクタマーゼを利用したPCA法について説明する。

【0025】

β -ラクタマーゼは細菌由来の β -ラクタム環切断酵素である。N末端側の α 197断片（25～197残基）とC末端側の ω 198断片（198～288残基）に分割し、それぞれを目的タンパク質との融合タンパク質として発現すると、その両者が結合する場合にのみ β -ラクタマーゼタンパク質の立体構造が回復し、活性を示す。 β -ラクタマーゼ活性は細胞透過性の蛍光プローブCCF2/AM（CCF2アセトキシメチルエステル）により検出される。CCF2/AMは、セファロスボリン分子の両末端に2種類の異なる蛍光物質クマリン及びフルオレセインが結合した構造をしており、前者をドナー、後者をアクセプターとする分子内FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）を呈する。すなわち、クマリンを409nmの光で励起すると、フルオレセイン由来の520nmの蛍光を発することになる。しかし、CCF2が β -ラクタマーゼ活性による分解を受けると、両者が解離し、FRETは観察されなくなるため、409nmの光の励起によってクマリン本来の447nmの蛍光を発するようになる。447nmの蛍光を測定することにより、 β -ラクタマーゼの活性、すなわち、目的タンパク質の相互作用の強さを測定することが可能となる。

【0026】

したがって、PCA法を利用して本発明のスクリーニング方法を行うには、以下の方法によればよい。機能タンパク質の二つの断片A1又はA2にp73又はIKK- α を融合させた融合タンパク質を細胞に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該細胞を培養し、培養した細胞における機能タンパク質の活性を測定し、被検化合物存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性が、被検化合物非存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性よりも上昇している場合、被検化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

【0027】

また、本発明のアポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも強い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを促進する

化合物と判定する判定工程と、を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なるアポトーシス促進性化合物が得られる。

【0028】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法を用いたスクリーニング方法を以下に説明する。

【0029】

まず、p73及びIKK- α を発現した細胞を調製する。p73及びIKK- α を発現した細胞としては、両者を発現している細胞、どちらか一方を発現している細胞に他方をトランスフェクションさせて両者を発現させた細胞、又は、いずれも発現していない細胞に両者をコトランスフェクションさせた細胞のいずれを用いてもよい。また、シスプラチニン処理等の薬剤処理などにより、p73を発現させた細胞を用いてもよい。そして、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で前記細胞を培養する。培養時間は、p73とIKK- α とが相互作用する時間であればよく、用いる細胞の種類によって異なるが、例えば、p73及びIKK- α をコトランスフェクトした場合、12～48時間程度である。

【0030】

次に、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する。相互作用の測定には、まず、培養した細胞を粉砕して細胞可溶化物を調製する。細胞可溶化物は細胞全体の細胞可溶化物を用いてもよいが、p73とIKK- α とは核内で相互作用することから、核画分の細胞可溶化物を用いることが好ましい。調製した細胞可溶化物にp73又はIKK- α のいずれか一方の分子に対する抗体を加えて免疫沈降を行う。そして、得られた沈殿物（p73及びIKK- α の複合体が含まれている）を他方の分子に対する抗体を用いた免疫学的手法（イムノプロット等）により、p73及びIKK- α の複合体を検出、定量することにより、p73とIKK- α との相互作用を測定できる。

【0031】

測定の結果、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも強い場合（タンパク質複合体の形成量が多い場合）に、当該化合物を陽性と判定する。すなわち、当該化合物はアポトーシスを促進する化合物であると判定できる。

【0032】

（アポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法）

本発明のアポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法は、p73とIKK- α との相互作用を阻害する化合物を、アポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物が得られる。

【0033】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、酵母ツーハイブリッド法やPCA法（プロテイン・フレグメント・コンプリメンテーション・アッセイ）が挙げられる。酵母ツーハイブリッド法及びPCA法の概要は先に説明した通りである。

【0034】

酵母ツーハイブリッド法を利用した本スクリーニング方法は以下の通りである。ペイトとしてp73又はIKK- α の一方を、プレイとしてp73又はIKK- α の他方を酵母に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該酵母を培養し、培養したそれぞれの酵母のレポーター遺伝子の転写活性（p73とIKK- α との相互作用の強さを表す）を測定し、被検化合物存在下の転写活性が被検化合物非存在下の転写活

性よりも低下している場合、被検化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。

【0035】

PCA法を利用した本スクリーニング方法は以下の通りである。機能タンパク質の二つの断片A1又はA2にp73又はIKK- α を融合させた融合タンパク質を細胞に発現させ、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で当該細胞を培養し、培養したそれぞれの細胞における機能タンパク質の活性を測定し、被検化合物存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性が、被検化合物非存在下培養した細胞における機能タンパク質の活性よりも低下している場合、被検化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。

【0036】

本発明のアポトーシスを抑制する化合物のスクリーニング方法は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下において、p73及びIKK- α を発現した細胞を培養する培養工程と、培養したそれぞれの細胞における、p73とIKK- α との相互作用を測定する測定工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも弱い場合に、当該被検化合物をアポトーシスを抑制する化合物と判定する判定工程と、を備える。本スクリーニング方法はp73とIKK- α とが直接相互作用するという新たな分子メカニズムに基づいており、今までとは作用機序が全く異なる抗アポトーシス性化合物が得られる。

【0037】

具体的なスクリーニング方法は、当業者にとって公知のタンパク質間相互作用を測定する系が利用可能であり、例えば、免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法を用いたスクリーニング方法は、化合物を判定する工程を除いて先に説明したのと同様である。すなわち、p73とIKK- α との相互作用測定の結果、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるp73とIKK- α との相互作用よりも弱い場合（タンパク質複合体の形成量が少ない場合）に、当該化合物を陽性と判定する。すなわち、当該化合物はアポトーシスを抑制する化合物であると判定できる。

【0038】

（アポトーシス促進剤）

本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質はIKK- α タンパク質を表す。本発明者らが見出した分子メカニズムによれば、IKK- α はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進する。したがって、本アポトーシス促進剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを促進することが可能である。また、癌細胞、癌組織又は癌を患っている個体に本アポトーシス促進剤を接触又は投与することにより、癌の抑制・治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス促進剤は抗癌剤として用いることが可能である。本アポトーシス促進剤を接触又は投与する場合には、p73とともに接触又は投与することが好ましい。アポトーシスがより一層促進されるからである。

【0039】

また、本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号24に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明のアポトーシス促進剤は、配列番号23で表される塩基配列からなる核酸であることが好ましい。本発明者らが見出した分子メカニズムによれば、IKK- α はp73と直接相互作用することによりp73を安定化し、p73が誘導するアポトーシスを促進する。したがって、本アポトーシス促進剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを促進することが可能である。また、癌細胞、癌組織又は癌を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、癌の抑制・治療を行

うことが可能である。すなわち、本アポトーシス促進剤は抗癌剤として用いることが可能である。本アポトーシス促進剤を接触又は投与する場合には、p73とともに接触又は投与することが好ましい。アポトーシスがより一層促進されるからである。

【0040】

(アポトーシス抑制剤)

本発明のアポトーシス抑制剤は、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、IKK- α の44番目のリジン残基がアラニン残基に置換されたIKK- α (K44A)タンパク質を表す。本発明者らは、IKK- α (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に本アポトーシス抑制剤を接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

【0041】

また、本発明のアポトーシス抑制剤は、配列番号25に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明者らは、IKK- α (K44A)はp73と結合するもののp73を安定化せず、p73が誘導するアポトーシスを抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は癌組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

【0042】

本発明のアポトーシス抑制剤は、配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質は、UFD2aタンパク質を表す。本発明者らは、UFD2aがp73を分解する一方でp53を分解せず、p73が仲介するアポトーシスを選択的に抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は組織、若しくは神経変性疾患を患っている個体に本アポトーシス抑制剤を接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

【0043】

また、本発明のアポトーシス抑制剤は配列番号26に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸からなる。本発明者らは、UFD2aがp73を分解する一方でp53を分解せず、p73が仲介するアポトーシスを選択的に抑制することを明らかにした。したがって、本アポトーシス抑制剤を適切なベクターに組み込み、当該ベクターを細胞、組織又は個体に接触又は投与することにより、細胞、組織又は個体のアポトーシスを抑制することが可能である。また、アポトーシスを起こしている細胞又は癌組織、若しくは

神経変性疾患を患っている個体に前記ベクターを接触又は投与することにより、神経変性疾患の治療を行うことが可能である。すなわち、本アポトーシス抑制剤は神経変性疾患の治療剤として用いることが可能である。本アポトーシス抑制剤を接触又は投与する場合には、接触又は投与する細胞、組織又は個体がp 73を発現していることを確認するのが好ましい。アポトーシスをより確実に抑制することができるからである。

【実施例】

【0044】

以下、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0045】

(細胞培養及びトランスフェクション)

アフリカミドリザル肝細胞COS7細胞及びヒト骨肉種細胞U2OS細胞は、10% (v/v) 熱不活性化ウシ胎児血清(FBS; インビトロジエン) 及びペニシリン(100 IU/mL) /ストレプトマイシン(100 µg/mL) を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM) で培養した。ヒト肺癌細胞H1299細胞及びマウス線維芽細胞L929細胞は、10% 熱不活性化FBS及び抗生素混合物を含むRPMI1640培地で培養した。培養物は、5% CO₂ の水飽和雰囲気下、37°Cで維持した。

【0046】

一過的なトランスフェクションを行うため、COS7細胞を50%コンフルエントになるまで培養し、FuGENE 6 transfection reagent(ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ)を用いて、製造業者の説明書に従い、所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞にトランスフェクトした。H1299細胞及びU2OS細胞は、製造業者の説明書に従い、LipofectAMINE transfection reagent(インビトロジエン)でトランスフェクトした。pcDNA3 empty plasmid(インビトロジエン)をプランクプラスミドとして用い、一過的なトランスフェクションで導入されるDNA量のバランスをとった。

【0047】

(細胞生存アッセイ)

100 µLの完全培地を添加してある96ウェル組織培養皿に、U2OS細胞を5×10³/ウェルの密度で播き、一晩付着させた。シスプラチンの原液を0.45 µmポアサイズのフィルターでろ過滅菌し、リン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈した。シスプラチンを最終濃度が20 µMとなるように培養物に加え、細胞の生存率を測定した。生存率は、改良3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド(MTT)アッセイを用いて、シスプラチンの添加から所定時間後に測定した。MTTアッセイは、10 µLのMTT溶液を各ウェルに添加し、培養物を37°Cで1時間インキュベーションして行った。マイクロプレートリーダー(モデル450;バイオラッド)を用いて、各ウェルの570 nmにおける吸光度を測定した。

【0048】

(RNA抽出及びRT-PCR)

Rneasy Mini Kit(キアゲン)を用い、製造業者のプロトコールに従って、シスプラチン(最終濃度: 20 µM)に曝したU2OS細胞から全RNAを抽出した。逆転写反応は、全RNA(5 µg)をSuperScript II reverse transcriptase(インビトロジエン)及びランダムプライマーと混合し、42°Cで1時間インキュベーションすることを行った。反応が完了したら、cDNAを水で希釈し、15 µLの反応溶液(100 µMの各デオキシヌクレオシド三リン酸、1×PCRバッファー、1 µMの各プライマー、0.2 ユニットのrTaq DNA polymerase(タカラバイオ)を含む)で増幅した。

【0049】

用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、以下のとおりである。
IKK- α :

(フォワード、配列番号1) 5'-CCGACTTCAGCAGAACATGA-3',

(リバース、配列番号2) 5'-TGGGGACAGTGAACAAAGTGA-3',

I KK- β :

(フォワード、配列番号3) 5'-AACCAAGCATCCAGATTGACC-3',

(リバース、配列番号4) 5'-CTCTAGGTCTGTCCAGCGTTC-3',

I KK- γ :

(フォワード、配列番号5) 5'-CCTCACTCCCTGTGAAGCTC-3',

(リバース、配列番号6) 5'-GAGACTCTTGGCCCAGTACCG-3',

I κ B- α :

(フォワード、配列番号7) 5'-GCAAAATCCTGACCTGGTGT-3',

(リバース、配列番号8) 5'-GCTCGTCCTCTGTGAACCTCC-3',

p53 :

(フォワード、配列番号9) 5'-ATTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAAC-3',

(リバース、配列番号10) 5'-ACCTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTG-3',

p73 α :

(フォワード、配列番号11) 5'-CCGGGAGAACTTTGAGATCC-3',

(リバース、配列番号12) 5'-ATCTTCAGGGCCCCCAGGTC-3',

p21WAF1 :

(フォワード、配列番号13) 5'-CCGGGAGAACTTTGAGATCC-3',

(リバース、配列番号14) 5'-ATCTTCAGGGCCCCCAGGTC-3',

Bax :

(フォワード、配列番号15) 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3',

(リバース、配列番号16) 5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3',

GAPDH :

(フォワード、配列番号17) 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3',

(リバース、配列番号18) 5'-TCCACCACCCCTGTTGCTGTA-3',

GAPDHの発現を測定して、内部標準とした。PCR増幅産物を、TAEバッファー(40 mMのTris-C1、1 mMのEDTA)中、1.5%アガロースゲルの電気泳動にて分離し、エチジウムプロマイド(ポストステイン)で可視化した。

【0050】

(I KK- α を標識するFLAGエピトープ)

FLAGエピトープでI KK- α のN末端をエピトープ標識し、pcDNA3発現プラスミドにサブクローニングした。FLAG標識したI KK- α の発現プラスミドを得るために、I KK- α のコード領域をPCRで増幅した。PCRに用いたオリゴヌクレオチドプライマーは以下のとおりである。

(フォワード、配列番号19) 5'-CCGGAATTCGAGCGGCCCCGGGGCTGGGC-3',

(リバース、配列番号20) 5'-CCGCTCGAGCGGTATTCTGCTAACCAACTCCAAATCAAGACTCAT-3',

フォワードプライマーの下線部分のヌクレオチドは、EcoRIの切断部位を表し、リバースプライマーの下線部分のヌクレオチドは、XhoIの切断部位を表す。PCR産物をEcoRI及びXhoIで完全に消化し、pcDNA3-FLAG発現プラスミドの同一切断部位に導入し、FLAGタグの下流にインフレームとなるようにした。それは、FLAGエピトープで標識されたI KK- α の全長をコードする(pcDNA-FLAG-I KK- α)。コンストラクトは、制限酵素による消化及びDNAシーケンシングにより確認した。

【0051】

(キナーゼ活性のないI KK- α の変異体の作製)

PhusionTM High-Fidelity DNAポリメラーゼ(ストラタジーン)を用い、製造業者の説明書に従って、K44A変異をワイルドタイプのI KK- α に導入した。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

5' -GCGTCTTGTCTTAGAGCTAAGTCCAAAAACAGAGAGCGATGGTGCAT-3' (フォワード、配列番号21、下線部分が44番目のアミノ酸のA1aをコードする)

5' -AATTGCTATTTGAGATCAAGTCCCGGTGCTGGTACAGACTGACGTTCCC-3' (リバース、配列番号22)

【0052】

T4DNAライゲース(タカラバイオ)の存在下、PCR産物をセルフライゲーションさせ、それらの核酸配列を決定し、期待通りの変異が存在し、かつランダム変異が存在しないことを確かめた。

【0053】

(イムノプロット)

細胞に全部で2 μ gの発現プラスミドを一過的にトランسفエクトした。トランسفエクションの48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、溶解バッファー(pH8.0; 25mMのTris-C1、137mMの塩化ナトリウム、1%のTriton X-100、1mMのフェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)、プロテアーゼインヒビターミックス(ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ)を含む)に懸濁させ、軽く超音波処理を行った。15000rpmで10分間、遠心を行い、上清を回収し、ラッドフォード法(バイオラッド)により、タンパク濃度を測定した。等量の細胞全体の可溶化物(タンパク量: 50 μ g)をLaemmliのSDSサンプルバッファー中で煮沸して変性させ、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)で分離し、10%メタノール含有トリス-グリシンバッファー中でポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜(Immobilon-P; ミリポア)に室温下にて1時間で転写した。5%の脱脂乳及び0.1%のTween20を含むトリス緩衝生理食塩水(TBS-T)で室温にて1時間、膜をブロックした。

【0054】

その後、抗FLAGモノクローナル抗体(M2; シグマ)、抗HAモノクローナル抗体(12CA5; ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ)、抗p73モノクローナル抗体(Ab-4; ネオマーカーズ)、抗p53モノクローナル抗体(DO-1; オンコジー・シリサーチプロダクツ)、抗Baxモノクローナル抗体(6A7; eバイオサイエンス)、抗IKK- α ポリクローナル抗体(M-280; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗IKK- β ポリクローナル抗体(H-470; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗IKK- γ ポリクローナル抗体(FL-417; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗p65ポリクローナル抗体(C-20; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗I κ B- α ポリクローナル抗体(C-21; サンタクルーズバイオテクノロジー)、抗アクチンポリクローナル抗体(20-33; シグマ)又は抗p21WAF1ポリクローナル抗体(H-164; サンタクルーズバイオテクノロジー)を一次抗体に用いて反応させた。一次抗体と反応させた後、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウス又は抗ウサギ二次抗体(セルシグナリングテクノロジー)をTBS-Tで2000倍に希釈したものを用いて、室温にて1時間反応させた。enhanced chemiluminescence system(ECL; アマシャム・ファルマシア・バイオテック)を説明書に従って用いることにより、免疫反応性のタンパク質は最終的に可視化された。

【0055】

(細胞成分分画)

核抽出物及び細胞質抽出物を調製するため、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、溶解バッファー(pH7.5; 10mMのTris-C1、1mMのEDTA、0.5%のNonidet P-40(NP-40)、1mMのPMSF、プロテアーゼインヒビターミックス(シグマ)を含む)に懸濁させた。懸濁させた細胞を4°Cにて30分間インキュベーションし、5000rpmで10分間、遠心を行い、可溶性画分を回収した(これを細胞質抽出物とする)。不溶性画分を溶解バッファーで洗浄し、1×LaemmliのSDSサンプルバッファー(pH6.8; 62.5mMのTris-C1、2%のSDS、2%の β -メルカプトエタノール、0.01%のブロモフェノールブルーを含む)に溶解して

核抽出物を回収した。核及び細胞質画分を抗ラミンBモノクローナル抗体 (Ab-1; オンコジーンリサーチプロダクツ) 又は抗 α -チューブリンモノクローナル抗体 (DM1A; セルシグナリングテクノロジー) を用いたイムノプロット分析に供した。

【0056】

(タンパク分解速度分析)

HA-p73 α 発現プラスミドを、IKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞に一過的にトランスフェクトした。シクロヘキシミド (最終濃度: 100 μ g/mL) による前処理から所定時間後に、細胞を回収した。細胞全体の可溶化物を調製し、抗p73モノクローナル抗体又は抗アクチンポリクローナル抗体によるイムノプロット分析を行った。デンシトメトリーを用いて、アクチンで規格化したHA-p73 α の量を定量した。

【0057】

(ユビキチン化アッセイ)

量を変化させたIKK- α 発現プラスミドの存在下又は非存在下、HA-p73 α 及びHA-Ubをコードする発現プラスミドを一定量、COS7細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションから4時間後、プロテアソームインヒビターであるMG-132 (最終濃度: 20 μ M) に6時間、細胞を曝し、細胞全体の可溶化物をまず抗p73モノクローナル抗体と免疫沈降させ、次に抗HAモノクローナル抗体 (12CA5; ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ) を用いたイムノプロットを行うことにより、ユビキチン化レベルを分析した。

【0058】

(免疫沈降分析)

細胞全体の可溶化物を15000 rpmで15分間、遠心して細胞片を除いた。プロインG-セファロース (50%スラリー、30 μ L; アマシャム・ファルマシア・バイオテック) を用いて、4°Cにて30分間、得られた上清を前処理した。遠心した後、抗HAポリクローナル抗体 (医学生物学研究所) 又は抗FLAGモノクローナル抗体を用いて、上清を4°Cにて2時間インキュベーションした。4°Cにて30分間、免疫複合体をプロインG-セファロースビーズで沈降させた。軽く遠心して回収した後、免疫沈降物を溶解バッファーで3回洗浄し、30 μ Lの2×LaemmliのSDSサンプルバッファーに懸濁させ、100°Cにて5分間処理した。上清を10%SDS-PAGEにロードし、上述したようにイムノプロットで分析を行った。

【0059】

(GSTプルダウンアッセイ)

FLAG-IKK- α を発現しているCOS7細胞から調製した細胞全体の可溶化物をグルタチオン-Sトランスフェラーゼ (GST) 又はGST融合タンパク質と混ぜ、グルタチオン-セファロースビーズ (アマシャム・ファルマシア・バイオテック) の存在下、4°Cにて2時間、ゆっくり振盪しながらインキュベーションした。その後、軽く遠心してセファロースビーズを沈殿させ、1mMのPMSFを含むNETNバッファー (pH 7.5; 50 mM Tris-CI、150 mMの塩化ナトリウム、0.1%のNP-40、1 mMのEDTA) で激しく洗浄した。結合したタンパク質は、30 μ Lの2×LaemmliのSDSサンプルバッファーを加えてビーズから溶出させ、5分間煮沸し、10%SDS-PAGEで分離した。タンパク質をPVDF膜に転写し、上述したようにFLAG-IKK- α でイムノプロットした。

【0060】

(免疫蛍光分析)

U2OS細胞をカバーガラス上で培養し、所定の発現プラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、-20°Cにて20分間、100%メタノールで固定した。細胞をPBSで2回洗浄し、3%ウシ血清アルブミン (BSA) のPBS溶液 (0.1%グリシン及び0.1%アジ化ナトリウムを含む) を用いて室温にて1時間ブロッキンした。その後、細胞をPBSで洗浄し、50倍希

糢した抗ラミンBモノクローナル抗体及び200倍希釈した抗FLAGポリクローナル抗体(シグマ)を同時に用いて、室温にて1時間インキュベーションした。結合した免疫グロブリンを検出するため、200倍に希釈したローダミン又はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識した二次抗体(インビトロジエン)と、室温にて1時間、インキュベーションした。二次抗体とインキュベーションした後、カバーグラスをPBSで洗浄し、Fluoromount-G(サザンバイオテック)を用いてガラススライド上にマウントして、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス)で調べた。

【0061】

(ルシフェラーゼレポーターアッセイ)

p53を欠損したH1299細胞を 5×10^4 細胞/ウェルの密度で12ウェル組織培養皿に播き、以下のもので細胞を一過的にトランスフェクトした: 100ngのルシフェラーゼレポーターコンストラクト(p21WAF1、MDM2又はBaxプロモーターに由来するp53/p73応答配列を保有する)、10ngのpRL-TKウミシイタケルシフェラーゼcDNA、及び25ngの所定の発現プラスミド(p53、HA-p73 α 又はHA-p73 β)を量を変化させたIKK- α 又はFLAG-IKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに。pcDNA3 empty plasmidを用いて、トランスフェクションあたりのトータルのDNA量は一定(510ng)に保った。トランスフェクションから48時間後、細胞を氷冷したPBSで2回洗浄し、passive lysis buffer(プロメガ)に懸濁させた。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム(プロメガ)を用いて、説明書に従い、ホタル及びウミシイタケの両ルシフェラーゼ活性を測定した。蛍光強度はTD-20ルミノメーター(ターナーデザイン)を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼのシグナルを、ウミシイタケルシフェラーゼのシグナルに基づいて規格化した。少なくとも3回のトランスフェクションを行って得られた結果を、平均値±標準偏差で表した。

【0062】

(アポトーシスアッセイ)

p73 α 及びIKK過剰発現を介したアポトーシスを検出するため、 1.5×10^4 細胞/ウェルの密度でH1299細胞を6ウェル組織培養皿に播いた。翌日、50ngの β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド及び50ngのHA-p73 α 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 又はIKK- β 発現ベクター(100、200又は400ng)の存在下又は非存在下、細胞に一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を氷冷したPBSで洗浄し、0.4%トリパンブルー(PBS溶液)で室温にて10分間染色した。その後、細胞をPBSで2回洗浄し、2.5%のグルタルアルデヒド、1mMの塩化マグネシウム及び2mMのEGTAを含むPBSで10分間固定し、Red-Gal(リサーチオルガニクス)を用いて、Bayon, Y. et al., Mol. Cell. Biol. 23: 1061-1074 (2003)に記載の方法で2時間染色した。トランスフェクトした細胞を可視化するためのマーカーとしてRed-Galを用い、トランスフェクタントにどのくらいアポトーシスが生じているかを評価した。Red-Gal及びトリパンブルーの二重染色によって暗いピンクーパープルになっている細胞を集めて、アポトーシス細胞をスコア化した。結果は3回の独立したトランスフェクション—それぞれ、3回以上行った—の平均で表した。

【0063】

(実施例1) U2OS細胞におけるシスプラチンを介したアポトーシス中のIKK- α の誘導

DNA損傷により誘導されるシグナル伝達において、I κ Bキナーゼ(IKks)の潜在的な機能を規定するため、DNAを損傷する化学療法剤であるシスプラチンにU2OS細胞をさらして、それらのタンパク質及びmRNAの発現レベルを調べた。細胞生存アッセイにより調べたところ、U2OS細胞は時間依存的にアポトーシスを起こしていた(図1)。イムノプロット分析を行ったところ、p53及びそのホモログであるp73 α (両者はDNA損傷応答における主要なメディエーターである(Melino, G. et al., Nat. Re

v. Cancer 2: 605-615 (2002). 及び Vousden, K. H. et al., Nat. Rev. Cancer 2: 594-604 (2002).) は、シスプラチニに応答してタンパク質レベルで顕著に誘導された (図 2)。その一方、p 53 及び p 73 α の mRNA の発現は誘導されなかった (図 3)。これらの蓄積は、p 21 WAF1 や Bax のような下流のエフェクターに関連している。特に、シスプラチニ処理により、IKK- α が顕著に蓄積し、シスプラチニ曝露から 12 ~ 36 時間後の間にその誘導が認められた (図 2)。シスプラチニ処理の 12 時間後、IKK- γ (NEMO) のタンパク質レベルが一過的に上昇したが、24 ~ 36 時間までシスプラチニ処理時間を延長すると IKK- γ レベルは減少し、未処理の細胞とほとんど区別できない程度であった。対照的に、シスプラチニ処理によって IKK- β の量はほとんど変化しなかった。RT-PCR 分析の結果、IKK- α 及び IKK- β の mRNA の発現はシスプラチニ処理で変化せず、その一方、IKK- γ の mRNA の発現レベルは、シスプラチニ処理に応じて時間依存的に、顕著な増加が認められた (図 3)。興味深いことに、イムノプロット分析の結果は、シスプラチニ処理によってリン酸化型の I κ B- α (特徴がよく分かっている、IKK 複合体の基質である) が顕著に増加していることを示している。

【0064】

以上の結果をあわせると、DNA 損傷で誘導される p 53 及び p 73 の蓄積は IKK- α のアップリギュレーションと関連していること、及び、DNA 損傷が介するアポトーシス経路の間にそれらの機能的な相互作用が存在する可能性があることが示唆された。

【0065】

(実施例 2) シスプラチニに応答した IKK- α の核内の蓄積

CRM-1 依存的に、IKK- α が核と細胞質との間を往復していることが、最近示された (Birbach, A. et al., J. Biol. Chem. 277: 10842-10851 (2002).)。また、核の IKK- α は、サイトカイン曝露後の生存経路を制御する NF- κ B 応答遺伝子をトランス活性化する能力を有している (Yamamoto, Y. et al., Nature 423: 655-659 (2003). 及び

Anest, V. et al., Nature 423: 659-663 (2003).)。これらを踏まえて、内在性の IKKs の細胞下の局在がシスプラチニに応じて変化するかを調べた。

【0066】

シスプラチニに曝した又は未処理の U2OS 細胞から、核及び細胞質抽出物を調製し、所定の抗体とのイムノプロットに供した。核及び細胞質画分の純度は、それぞれ、抗ラミン B 抗体及び抗 α -チューブリン抗体を用いたイムノプロットで確認した。既報の結果と一致して、IKK- α は核及び細胞質の両方に局在しており、他方、IKK- β はもっぱら細胞質で発現していた (図 4)。細胞質中の IKK- α 、IKK- β 及び IKK- γ の量は、シスプラチニ処理にかかわらず変化しなかった。シスプラチニ処理によって、時間依存的に IKK- α は核内で顕著に蓄積した一方、IKK- β は核内でそれほど蓄積しなかった。また、IKK- γ の一過的な核内の蓄積が、シスプラチニ処理の 12 時間後に認められた。シスプラチニに応答して I κ B- α のリン酸化が亢進することと一致して、細胞質の I κ B- α は時間依存的に減少した。しかしながら、p 65-NF κ B サブユニット (RelA) の核内での蓄積に対して、シスプラチニ処理はほとんど影響を与えたかった。このことは、シスプラチニの存在によって、p 65 の核内移行が阻害されている可能性があることを示している。このように考えると、IKKs のうち、シスプラチニ処理によって IKK- α の顕著に核内に蓄積し、IKK- α はシスプラチニを介したアポトーシスの間に核内における何らかの機能を持っている可能性が考えられる。

【0067】

外因的に IKK- α を発現させると、内在性の IKK- α の挙動を左右するかを調べるため、イムノプロット及び免疫蛍光染色によって外因性の IKK- α の細胞内分布を調べた。FLAG-IKK- α 又は HA-p 73 α をコードする発現プラスミドをトランスフェクトした U2OS 細胞から、核及び細胞質画分を調製し、それぞれ、抗 FLAG 抗体又は抗 p 73 抗体を用いたイムノプロットに供した。図 5 (トランスフェクトの 48 時間後

の細胞のイムノプロットの結果を表している)に示したように、HA-p73 α はもっぱら核に局在しており、FLAG-IKK- α は、核及び細胞質の両方に存在していた。驚くべきことに、抗FLAG抗体及び抗ラミン抗体を用いた免疫蛍光染色の結果から、核マトリックスマークターであるラミンBと広範囲にわたって共存していることからも示されるとおり、外因性のIKK- α は細胞質及び核マトリックスに局在していることがはっきりと示された(図6)。興味深いことに、HA-p73 α はFLAG-IKK- α と共存して、核マトリックスに存在しており、これは、核のIKK- α がアポトーシス促進性のp73と相互作用し、その機能を調整している可能性を示唆している。

【0068】

(実施例3) シスプラチン曝露による、U2OS細胞におけるNF- κ Bの活性化の変化

上述の通り、核内のトランス活性化性p65サブユニットの量は、シスプラチン処理をしたU2OS細胞において変化しなかった。これらの結果を受け、シスプラチンに応答して、NF- κ Bが活性化するかどうかを調べた。NF- κ BレポータープラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞をシスプラチンで処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。シスプラチン処理は、NF- κ B依存性の転写活性化を亢進しなかった(図7)。マウス線維芽細胞であるL929細胞をTNF- α に曝すと、2時間後に、NF- κ Bに依存した転写活性化が認められた(図8)。L929細胞は、TNF- α 依存性のNF- κ Bの活性化を調べるために広く用いられている。また、L929細胞をTNF- α で処理すると、p65が核に顕著に蓄積する(図9)。以上から、TNF- α と異なり、NF- κ B依存性の転写活性化にシスプラチンが顕著な効果を及ぼさないことは、核内のp65の蓄積が調節されないためであると考えられる。

【0069】

(実施例4) IKK- α とp73の相互作用

哺乳動物の培養細胞において、IKK- α がp73と相互作用するかどうかを調べるために、トランスフェクトしたCOS7細胞から細胞全体の可溶化物を調製し、その可溶化物を抗FLAG抗体又は抗HA抗体と免疫沈降させ、それぞれ、抗p73又は抗FLAG抗体を使ったイムノプロットで分析した。図10に示したように、外因的に発現させたFLAG-IKK- α 及びHA-p73 α は、COS7細胞内で安定複合体を形成した。同様に、HA-p73 β はFLAG-IKK- α と免疫共沈降した(データは示さず)。対照的に、内在性のp53の免疫沈降をし、抗FLAG抗体でイムノプロットをしたところ、免疫共沈降したFLAG-IKK- α は検出されなかった(図11)。これは、細胞中において、IKK- α はp73と相互作用するが、p53とは相互作用しないことを示している。IKK- α との相互作用に関与するp73の決定基を同定するため、GSTに融合したp73の欠失変異体をいくつか作製し、インビトロのプルダウンアッセイにおいてFLAG-IKK- α への結合能を調べた。トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、オリゴマー化ドメイン及びSAMドメインを含むp73の機能的ドメインに基づいて、これらの変異体を設計した(図12)。FLAG-IKK- α は、GST-p73(114-328)には結合したが、他のGST融合タンパク質には結合しなかった(図13)。以上の結果から、IKK- α は、p73のDNA結合ドメインを介して、直接p73と相互作用していることが示唆された。

【0070】

(実験5) IKK α によるp73の安定化

既に報告されているように、p73と相互作用するいくつかのプロテインキナーゼ(例えば、c-Ab1及びPKC δ)は、p73を安定化することができる。IKK- α がp73の安定化に影響を与えるかどうか確かめるため、一定量のHA-p73 α 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞にトランスフェクトし、HA-p73 α のタンパク質レベルを調べた。図14に示したように、外因性のIKK- α の存在によって、HA-p73 α の量は顕著に増加した一方、FLAG-p53の安定化に対しては検出可能な効果をIKK- α は有していないかった。さ

らに、HA-p73 β もIKK- α によって安定化されるが、安定化の程度はHA-p73 α に比べれば少ない。IKK- α が増加した実験条件下では、p73 α のmRNAの発現レベルは顕著な変化を見せなかった(図14)。このことは、IKK- α がp73をタンパク質レベルで制御していることを示唆している。次に、一過的なトランスフェクションによって、IKK- β がp73及びp53の安定化に影響を与えるかを調べた。図15に示したように、FLAG-IKK- β はp73及びp53の両者の安定化には検出し得る効果を有していなかった。

【0071】

IKK- α がp73のターンオーバーを調節しているかどうかを確かめるため、トランスフェクトしたCOS7細胞におけるp73の分解速度を調べた。トランスフェクションの24時間後、細胞をシクロヘキシミドで処理した。指定した時間において、細胞全体の可溶化物を調整し、抗p73抗体を用いたイムノプロットに供した。図16に示したように、HA-p73 α 及びIKK- α の両方を発現させた細胞におけるHA-p73 α の分解速度は、HA-p73 α を単独で発現させた細胞における分解速度よりも遅かった。対照的に、FLAG-IKK- β が存在していても、HA-p73 α の半減期は伸びなかった(図17)。このように、IKK- α が仲介するp73の安定化は、p73の半減期の増加によるものである。

【0072】

Lee, C.-W. et al., Oncogene 18: 4171-4181 (1999).に記載されているように、p73の定常状態のレベルは、少なくとも一部はユビキチン-プロテアソーム経路を通じたタンパク質分解過程によって調節されている。p73のユビキチン化をIKK- α が阻害するかどうかを調べた。HA-p73 α 及びHA-ユビキチン発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 又はFLAG-IKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに、COS7細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞全体の可溶化物を免疫沈降及びイムノプロットにより分析し、HA-ユビキチンを含むp73 α が存在するかどうかを調べた。ユビキチン化したp73 α の量は、IKK- α の存在によって減少した(図18)一方、FLAG-IKK- β はp73 α のユビキチン化をいくぶん少ない程度であるが阻害した(図19)。

【0073】

これらの結果を合わせると、IKK- α はp73のユビキチン化を阻害し、それによりp73の安定化を向上させていることが強く示唆された。

【0074】

(実施例6) p53を欠損したH1299細胞における、p73が仲介するトランス活性化機能のIKK- α による増強

IKK- α 及びp73の相互作用の機能的な意味を探るため、まず、p73が仲介する転写活性化に及ぼすIKK- α の効果を調べた。p53を欠損したH1299細胞に、HA-p73 α 又はHA-p73 β 発現プラスミド、及びp21WAF1、Bax又はMDM2プロモーターのコントロール下のルシフェラーゼレポーターコンストラクトを、量を変化させたIKK- α の発現プラスミドと一緒に又は無しにトランスフェクトした。図20及び21に示したように、エンプティプラスミドの対照に比べて、異所的に発現したp73は、p53/p73応答性レポーターの転写を活性化した。また、IKK- α 単独では、ルシフェラーゼ活性にはほとんど影響を与えてなかった。HA-p73 α 又はHA-p73 β をIKK- α と共に発現させたときは、p73依存的な転写活性化の顕著な増加が、用量依存的に認められた。対照的に、p53応答性レポーター遺伝子活性の増加は、IKK- α によって誘導されなかった(図22)。IKK- α によって仲介されるp73依存性の転写の活性化の特異性を調べるために、IKK- β がp53/p73応答性プロモーターに対するp73転写活性を増強するかどうかを確かめた。図23に示したように、FLAG-IKK- β によって、p73依存性の転写活性化に顕著な変化は認められなかった。さらに、H1299細胞に外因的にIKK- α を発現させたところ、p73 α が仲介する内在性のp21WAF1の誘導が顕著にアップレギュレートした(図24)。

【0075】

これらの結果をあわせると、IKK- α はp73の転写活性を特異的に増強していることが示唆された。

【0076】

(実施例7) p73を介したアポトーシスに対するIKK- α の寄与

アポトーシスの調節のようなp73依存性の生物学的機能に対するIKK- α の潜在的な効果を調べた。一定量のHA-p73 α 及び β -ガラクトシダーゼの発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 又はFLAG-IKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに、H1299細胞に一過的にトランスフェクトした。 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドはトランスフェクトした細胞を同定するために使用した。トランスフェクションの48時間後、トリパンブルー(生育不能細胞)及びRed-Gal(トランスフェクトした細胞)を用いた二重染色に細胞を供し、紫色の細胞の数をスコア化した。図25及び26に示したように、IKK- α をHA-p73 α と共に発現させると、HA-p73 α 単独でトランスフェクトした場合に比べて、アポトーシスを起こした細胞の数が増加していた。対照的に、FLAG-IKK- β の共発現は、p73 α 依存性のアポトーシスには顕著な効果を及ぼさなかった(図27)。

【0077】

これらのデータは、p73依存性の転写活性化に対するIKK- α の正の効果と一致している。

【0078】

(実施例8) キナーゼ活性を欠損した変異型IKK- α がp73の安定化に及ぼす影響

IKK- α の内在的なキナーゼ活性がp73の安定化に必要かどうかを調べるため、変異型のIKK- α であるIKK- α (K44A)を作製した。この変異体は、ATP結合モチーフ中のリジン-44がアラニンに置換されている。Ling, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3792-3797 (1998)に記載されているとおり、この部位を変異すると、IKK- α のキナーゼ活性が損なわれる。免疫沈降分析から分かるように、哺乳動物の培養細胞において、IKK- α (K44A)は、p73 α との複合体を形成する能力は維持している(図28)。ワイルドタイプのIKK- α とは極めて対照的に、FLAG-IKK- α (K44A)の共発現は、外因的に発現させたHA-p73 α の細胞内レベルにはほとんど影響を及ぼさなかった(図29)。内在性のp73に対する、キナーゼ活性を欠損したIKK- α の効果を調べるため、U2OS細胞又はH1299細胞に、エンプティプラスミド又はFLAG-IKK- α (K44A)の発現プラスミドを一過的にトランスフェクトし、シスプラチンに24時間曝すか、未処理のままにした。細胞全体の可溶化物及び全RNAを調製し、それぞれ、イムノブロット及びRT-PCRに供した。図30に示したように、FLAG-IKK- α (K44A)発現プラスミドをトランスフェクトしたU2OS細胞において、シスプラチンを介した内在性のp73 α の安定化が阻害された。その一方、FLAG-IKK- α (K44A)は、内在性のp53の量には顕著な影響を与えたなかった。同じような結果は、p53を欠損したH1299細胞においても得られた(図32)。上記結果とよく一致するように、FLAG-IKK- α (K44A)の存在下、シスプラチンで誘導されるアポトーシスが顕著に阻害された(図31及び33)。

【0079】

このように、シスプラチンに誘導されるDNA損傷に応答するp73の安定化には、IKK- α のキナーゼ活性が必要であると考えられる。

【0080】

(実施例9) UFD2aの内在性p73への影響

UFD2aが内在性p73に及ぼす影響について調べるため、以下の実験を行った。COS7細胞にFLAG-UFD2a発現プラスミドをトランスフェクトした、又はトランスフェクトしなかった。トランスフェクションの24時間後、細胞をシスプラチン(最終

濃度 $20 \mu \text{g/mL}$) に 24 時間曝すか、未処理のままにした。トランスフェクトした細胞から細胞全体の可溶化物を調製し、p73 α 、p53 及び UFD2a の発現をイムノプロットにより解析した。なお、アクチンを添加のコントロールとして利用した。図 3-5 に示したように、FLAG-UFD2a 発現プラスミドをトランスフェクトした細胞において、シスプラチニによる p73 α の誘導が阻害された。その一方、内在性の p53 の量には影響を与えたなかった。この結果は、p73 α が UFD2a により分解されることを示唆している。

【0081】

(実施例 10) UFD2a の p73 依存性アポトーシスへの影響

UFD2a が p73 依存性のアポトーシスに及ぼす影響について調べるため、以下の実験を行った。p53 を欠損した H1299 細胞に所定の組み合わせ (HA-p73 α 、p53 及び FLAG-UFD2a) の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトした。トランスフェクションの 48 時間後、細胞を 3.7% ホルムアルデヒドで 30 分間、室温にて固定し、0.2% の Triton X-100 で 5 分間、室温にて透過処理を行い、3% BSA で 1 時間ブロッキンした。細胞を 1×PBS で 3 回洗浄し、DAPI (4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール; $1 \mu \text{g/mL}$) で 20 分間、室温にて染色した。GFP がトランスフェクトされた細胞のうち異常な核を有する細胞を顕微鏡下で計測した。図 3-6 に示したように、HA-p73 α 及び FLAG-UFD2a をコトランスフェクトすると、HA-p73 α 単独でトランスフェクトした場合に比べて、アポトーシスを起こしている細胞の数が減少した。対照的に、p53 及び FLAG-UFD2a をコトランスフェクトした場合は、p53 依存性のアポトーシスを抑制することができなかった。

【0082】

実施例 9 及び 10 の結果から、UFD2a は p73 α を分解し、p73 α のアポトーシス活性を低下させることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図 1】骨肉種細胞 U2OS 細胞をシスプラチニに曝したときの細胞生存率を表すグラフである。

【図 2】シスプラチニ処理した U2OS 細胞の細胞可溶化物のイムノプロットの結果を表す図である。

【図 3】シスプラチニ処理した U2OS 細胞からの RNA を RT-PCR 分析した結果を表す図である。

【図 4】シスプラチニ処理した U2OS 細胞の核画分 (N) 及び細胞質画分 (C) のイムノプロットの結果を表す図である。

【図 5】FLAG-IKK- α 又は HA-p73 α 発現プラスミドをトランスフェクトした U2OS 細胞の核画分 (N) 及び細胞質画分 (C) のイムノプロットの結果を表す図である。

【図 6】FLAG-IKK- α 発現プラスミドを単独で (上段の 3 つの写真) 又は HA-p73 α と一緒に (下段の 3 つの写真) 一過的にトランスフェクトした U2OS 細胞の関節免疫蛍光で二重染色した結果を表す写真である。マージは、FLAG-IKK- α 及び ラミン B、又は、HA-p73 α 及び FLAG-IKK- α の写真を併せた写真を表している。

【図 7】U2OS 細胞をシスプラチニ処理したときの、NF- κ B の活性化倍率を表すグラフである。

【図 8】L929 細胞を TNF- α 処理したときの、NF- κ B の活性化倍率を表すグラフである。

【図 9】TNF- α に曝された L929 細胞の核画分 (N) 及び細胞質画分 (C) のイムノプロットの結果を表す図である。IKK- α 及び p73 の相互作用

【図 10】所定の組合せの発現プラスミドを一過的にトランスフェクトした COS7

細胞を免疫沈降及びイムノプロットした結果を表す図である。IPは免疫沈降に用いた抗体を、IBはイムノプロットに用いた抗体を、それぞれ表す。

【図11】FLAG-IKK- α 発現プラスミドを一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、正常マウス血清(NMS)又は抗p53抗体を使った免疫沈降、及び、抗FLAG抗体を使ったイムノプロットした結果を表す図である。

【図12】GST-p73融合タンパク質の模式図である。TAはトランス活性化ドメインを、DBはDNA結合ドメインを、ODはオリゴマー化ドメインを、SAMはステライル α モチーフドメインを表す。

【図13】上図は、インビトロプルダウンアッセイにおいて、抗FLAG抗体を使ったイムノプロットの結果を表す図である。下図は、インビトロプルダウンアッセイにおいて、抗GST抗体を使ったイムノプロットの結果を表す図である。

【図14】所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞に一過的にコトランスフェクトしたときの、イムノプロット(上図)又はRT-PCR(下図)の結果を表す図である。

【図15】所定の組合せの発現プラスミドをCOS7細胞に一過的にコトランスフェクトしたときの、イムノプロットの結果を表す図である。

【図16】上図は、HA-p73 α 発現プラスミドを、単独で又はIKK- α 発現プラスミドと一緒に、一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、シクロヘキシミド(CHX)処理したときの、イムノプロットの結果を表す図である。下図は、残存しているHA-p73 α を表したグラフである。

【図17】上図は、HA-p73 α 発現プラスミドを、単独で又はIKK- β 発現プラスミドと一緒に、一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞を、シクロヘキシミド(CHX)処理したときの、イムノプロットの結果を表す図である。下図は、残存しているHA-p73 α を表したグラフである。

【図18】HA-p73 α 及びHA-Ub発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞をMG-132で処理し、抗p73抗体で免疫沈降し、抗HA抗体でイムノプロットした結果を表す図である。Ub x n-p73 α は、ゆっくり泳動しているユビキチン化型のHA-p73 α を表す。

【図19】HA-p73 α 及びHA-Ub発現プラスミドを、量を変化させたIKK- β 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞をMG-132で処理し、抗p73抗体で免疫沈降し、抗HA抗体でイムノプロットした結果を表す図である。Ub x n-p73 α は、ゆっくり泳動しているユビキチン化型のHA-p73 α を表す。

【図20】HA-p73 α をコードする発現プラスミドを、p21WAF1、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpCDNA3-IKK- α の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図21】HA-p73 β をコードする発現プラスミドを、p21WAF1、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpCDNA3-IKK- α の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図22】p53をコードする発現プラスミドを、p21WAF1、Bax又はMDM2プロモーター由来のp53応答配列を運ぶルシフェラーゼレポーター、ウミシイタケルシフェラーゼプラスミド(pRL-TK)とともに、量を変化させたpCDNA3-IKK- α の存在下又は非存在下、一過的にコトランスフェクトしたp-53

欠損H1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図23】HA-p73 α 発現プラスミドを、所定のルシフェラーゼレポーターコンストラクトとともに、量を変化させたIKK- β 発現プラスミドの存在下又は非存在下、一過的にトランスフェクトしたH1299細胞におけるp53/p73応答性プロモーターの転写活性化の倍率を表すグラフである。

【図24】一定量のHA-p73 α 発現プラスミドを、量を変化させたIKK- α 発現プラスミドと一緒に又は無しに、一過的にコトランスフェクトしたH1299細胞のイムノプロットの結果を表す図である。

【図25】所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞を二重染色した写真である。

【図26】所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図27】所定の発現プラスミドを一過的にトランスフェクションしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図28】所定の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞に対して免疫沈降及びイムノプロットを行った結果を表す図である。

【図29】所定の発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたCOS7細胞に対して免疫沈降及びイムノプロットを行った結果を表す図である。

【図30】FLAG-IKK- α (K44A)をトランスフェクトした/しないU2OS細胞をシスプラチンで処理した/処理しなかったときの、イムノプロット(上図)及びRT-PCR分析(下図)の結果を表す図である。

【図31】 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを、FLAG-IKK- α (K44A)発現プラスミドと一緒に又は無しに、トランスフェクトしたU2OS細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図32】FLAG-IKK- α (K44A)をトランスフェクトした/しないH1299細胞をシスプラチンで処理した/処理しなかったときの、イムノプロット(上図)及びRT-PCR分析(下図)の結果を表す図である。

【図33】 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを、FLAG-IKK- α (K44A)発現プラスミドと一緒に又は無しに、トランスフェクトしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【図34】DNA損傷により誘導されるアポトーシス中の、IKK、p73及びNFK- κ Bの模式図を表す。

【図35】FLAG-UFD2aをトランスフェクトした/しなかったCOS7細胞をシスプラチンで処理した/しなかったときの、イムノプロットの結果を表す図である。

【図36】所定の組み合わせの発現プラスミドを一過的にコトランスフェクトしたH1299細胞のうち、アポトーシスを起こしている細胞の割合を示したグラフである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Screening methods for pro-apoptotic compounds or anti-apoptotic compounds, an apoptosis accelerator and an apoptosis inhibitor

<130> 1082

<150> JP 2004-93266

<151> 2004-03-26

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 1

ccgactttag cagaacatga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 2

tggggacagt gaacaagtga

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-beta

<400> 3

a a c c a g c a t c c a g a t t g a c c

2 0

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for IKK-beta

<400> 4
c t c t a g g t c g t c c a g c g t t c 2 0

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for IKK-gamma

<400> 5
c c t c a c t c c c t g t g a a g c t c 2 0

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for IKK-gamma

<400> 6
g a g a c t c t t c g c c c a g t a c g 2 0

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for I kB-alpha

<400> 7
g c a a a a t c c t g a c c t g g t g t 2 0

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for IkB-alpha

<400> 8
g c t c g t c c t c t g t g a a c t c c 20

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for p53

<400> 9
a t t g a t g c t g t c c c g g a c g a t a t t g a a c 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for p53

<400> 10
a c c t t t t g g a c t t c a g g t g g c t g g a g t g 30

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for p73-alpha

<400> 11
c c g g g a g a a c t t t g a g a t c c 20

<210> 12

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for p73-alpha

<400> 12
atcttcaggccccaggtc 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for p21WAF1

<400> 13
ccgggagaacttttagatcc 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for p21WAF1

<400> 14
atcttcaggccccaggtc 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer for Bax

<400> 15
tttgcttcagggtttcatcc 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for Bax

<400> 16

c a g t t g a a g t t g c c g t c a g a

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for GAPDH

<400> 17

a c t g a c c t g c c g t c t a g a a

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for GAPDH

<400> 18

t c c a c c a c c t g t t g c t g t a

20

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 19

c c g g a a t t c g a g c g g c c c c g g g g c t g c g g c

31

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha

<400> 20

ccgctcgagc ggtcattctg ctaaccaact ccaatcaaga ctcat 45

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha (K44A)

<400> 21

gcgttttgtc gtttagagct aagttccaaa aacagagagc gatggtgccat 51

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for IKK-alpha (K44A)

<400> 22

aattgctatt ttgagatcaa gttcccggtg ctggtaacaga ctgacgttcc c 51

<210> 23

<211> 3579

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

cacgcgtccg cgagaaggag gactcgcaag cctcgccggc ccggAACGG cctcggaactg 60

tcgacggAAC ctgaggccgc ttgcctccc gccccatggg gggccccgg gggctgcggc 120

cgggcgccgg cggccctgg gagatcgccc agcggctggg cacccggccgc ttccggaaacg 180

tctgtctgtt ccagcatcgga aacttgcattc tcaaaatagc aatattatct tgcgtccatg 240

agctaagtac caaaaacaga gaacgatggt gccatgaaat ccagattatg aagaagttga 300

accatgccaa tgggtaaag gcctgtatg ttccgtggaa attgaatatt ttgattcatg 360

atgtgcctt tctagcaatg gaatactgtt ctggaggaga tctccgaaag ctgcgtcaaca 420

aaccagaaaa ttgttgtgga cttaaagaaa gccagatact ttctttacta agtgatata 480
ggtctggat tcgatatttgcatgaaaaca aaattataca tcgagatcta aaacctgaaa 540
acatagttct tcaggatgtt ggtggaaaga taatacataa aataattgtat ctggatatg 600
ccaaagatgt tgatcaagga agtctgtgtcatctttgt gggAACACTG cagtatctgg 660
ccccagagct ctttgagaat aagccttaca cagccactgt tgattattgg agctttggga 720
ccatggtatt tgaatgtatt gctggatata ggcctttttt gcatcatctg cagccatTTA 780
cctggcatga gaagatTAAG aagaaggatc caaagtgtat atttgcattgt gaagagatgt 840
caggagaagt tcggTTtagt agccatTTAC ctcaacccaa tagcctttgt agtttaatag 900
tagaaccat ggaaaactgg ctacagttga tgTTGAATTG ggaccctcag cagagaggag 960
gacctgttga ccttacttttga aagcagccaa gatgtttgt attaatggat cacatTTGA 1020
atttgaagat agtacacatc ctaaatatga ctTCTGCAAA gataattttctttctgttac 1080
cacctgatga aagtcttcat tcactacagt ctctgttattga gcgtgaaact ggaataaata 1140
ctggTTCTCA agaacttctt tcagagacag gaatttctct ggatcctcgg aaaccagcct 1200
ctcaatgtgt tctagatggatgttagaggct gtgatagcta tatggTTTAT ttgtttgata 1260
aaagtaaaac tgtatATGAA gggccatttgcTTCCAGAAG ttatctgtatgtgtaaatt 1320
atattgtaca ggacagcaaa atacagcttc caattataca gctgcgtaaa gtgtggcgtg 1380
aagcagtgcactatgtgtct ggactaaaag aagactatacg caggctctt cagggacaaa 1440
gggcagcaat gttaagtctt cttAGATATA atgctaactt aacaaaaatg aagaacactt 1500
tgatctcagc atcacaacaa ctgaaagcta aattggagtt tttcacaaa agcattcagc 1560
ttgactttgga gagatacagc gagcagatga cgtatggat atcttcagaa aaaatgctaa 1620
aagcatggaa agaaatggaa gaaaaggcca tccactatgc tgaggttggt gtcattggat 1680
acctggagga tcagattatgtctttgcattgtcgtaaatcat ggagctacag aagagccccct 1740
atggaagacg tcagggagac ttgatggaaatctctggaaaca gcgtgccatt gatctatata 1800
agcagttaaa acacagacct tcagatcact cctacagtgac cagcacagag atggtgaaaa 1860
tcattgtgcacactgtgcag agtcaggacc gtgtgctcaa ggagctgttt ggtcatttga 1920

cttgc cccaa gggtt caga gaaaggactg tggac ctcta tcatctgcta agtaat tag 3480
aagatattat ttgtcttaaa aaatgtgaaa tgctttata ttctaata gtttca cttt 3540
gtgttattaaa tggtttttaa attaaaaaaa aaaaaaaaa 3579

<210> 24
<211> 745
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu
1 5 10 15

Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr
20 25 30

Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys Ile Ala Ile Lys Ser Cys Arg Leu
35 40 45

Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu Arg Trp Cys His Glu Ile Gln Ile
50 55 60

Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Lys Ala Cys Asp Val Pro
65 70 75 80

Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His Asp Val Pro Leu Leu Ala Met Glu
85 90 95

Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg Lys Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn
100 105 110

Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln Ile Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile
115 120 125

Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His Glu Asn Lys Ile Ile His Arg Asp
130 135 140

Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile
145 150 155 160

His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Val Asp Gln Gly Ser
165 170 175

Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu
180 185 190

Phe Glu Asn Lys Pro Tyr Thr Ala Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly
195 200 205

Thr Met Val Phe Glu Cys Ile Ala Gly Tyr Arg Pro Phe Leu His His
210 215 220

Leu Gln Pro Phe Thr Trp His Glu Lys Ile Lys Lys Lys Asp Pro Lys
225 230 235 240

Cys Ile Phe Ala Cys Glu Glu Met Ser Gly Glu Val Arg Phe Ser Ser
245 250 255

His Leu Pro Gln Pro Asn Ser Leu Cys Ser Leu Ile Val Glu Pro Met
260 265 270

Glu Asn Trp Leu Gln Leu Met Leu Asn Trp Asp Pro Gln Gln Arg Gly
275 280 285

Gly Pro Val Asp Leu Thr Leu Lys Gln Pro Arg Cys Phe Val Leu Met
290 295 300

Asp His Ile Leu Asn Leu Lys Ile Val His Ile Leu Asn Met Thr Ser
305 310 315 320

Ala Lys Ile Ile Ser Phe Leu Leu Pro Pro Asp Glu Ser Leu His Ser
325 330 335

Leu Gln Ser Arg Ile Glu Arg Glu Thr Gly Ile Asn Thr Gly Ser Gln

340

345

350

Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Ser Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala
355 360 365

Ser Gln Cys Val Leu Asp Gly Val Arg Gly Cys Asp Ser Tyr Met Val
370 375 380

Tyr Leu Phe Asp Lys Ser Lys Thr Val Tyr Glu Gly Pro Phe Ala Ser
385 390 395 400

Arg Ser Leu Ser Asp Cys Val Asn Tyr Ile Val Gln Asp Ser Lys Ile
405 410 415

Gln Leu Pro Ile Ile Gln Leu Arg Lys Val Trp Ala Glu Ala Val His
420 425 430

Tyr Val Ser Gly Leu Lys Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Phe Gln Gly Gln
435 440 445

Arg Ala Ala Met Leu Ser Leu Leu Arg Tyr Asn Ala Asn Leu Thr Lys
450 455 460

Met Lys Asn Thr Leu Ile Ser Ala Ser Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu
465 470 475 480

Glu Phe Phe His Lys Ser Ile Gln Leu Asp Leu Glu Arg Tyr Ser Glu
485 490 495

Gln Met Thr Tyr Gly Ile Ser Ser Glu Lys Met Leu Lys Ala Trp Lys
500 505 510

Glu Met Glu Glu Lys Ala Ile His Tyr Ala Glu Val Gly Val Ile Gly
515 520 525

Tyr Leu Glu Asp Gln Ile Met Ser Leu His Ala Glu Ile Met Glu Leu
530 535 540

Gln Lys Ser Pro Tyr Gly Arg Arg Gln Gly Asp Leu Met Glu Ser Leu
545 550 555 560

Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr Lys Gln Leu Lys His Arg Pro Ser
565 570 575

Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Met Val Lys Ile Ile Val His
580 585 590

Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val Leu Lys Glu Leu Phe Gly His Leu
595 600 605

Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln Lys Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys
610 615 620

Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Met
625 630 635 640

Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys Glu Ile Trp His Leu Leu Lys Ile
645 650 655

Ala Cys Thr Gln Ser Ser Ala Arg Ser Leu Val Gly Ser Ser Leu Glu
660 665 670

Gly Ala Val Thr Pro Gln Thr Ser Ala Trp Leu Pro Pro Thr Ser Ala
675 680 685

Glu His Asp His Ser Leu Ser Cys Val Val Thr Pro Gln Asp Gly Glu
690 695 700

Thr Ser Ala Gln Met Ile Glu Glu Asn Leu Asn Cys Leu Gly His Leu
705 710 715 720

Ser Thr Ile Ile His Glu Ala Asn Glu Glu Gln Gly Asn Ser Met Met
725 730 735

Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr Glu

<210> 25
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> IKK-alpha (K44A)

<400> 25

Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu
 1 5 10 15

Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr
 20 25 30

Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys Ile Ala Ile Ala Ser Cys Arg Leu
 35 40 45

Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu Arg Trp Cys His Glu Ile Gln Ile
 50 55 60

Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Lys Ala Cys Asp Val Pro
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His Asp Val Pro Leu Leu Ala Met Glu
 85 90 95

Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg Lys Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn
 100 105 110

Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln Ile Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile
 115 120 125

Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His Glu Asn Lys Ile Ile His Arg Asp
 130 135 140

Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile

145

150

155

160

His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Val Asp Gln Gly Ser
 165 170 175

Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu
 180 185 190

Phe Glu Asn Lys Pro Tyr Thr Ala Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly
 195 200 205

Thr Met Val Phe Glu Cys Ile Ala Gly Tyr Arg Pro Phe Leu His His
 210 215 220

Leu Gln Pro Phe Thr Trp His Glu Lys Ile Lys Lys Lys Asp Pro Lys
 225 230 235 240

Cys Ile Phe Ala Cys Glu Glu Met Ser Gly Glu Val Arg Phe Ser Ser
 245 250 255

His Leu Pro Gln Pro Asn Ser Leu Cys Ser Leu Ile Val Glu Pro Met
 260 265 270

Glu Asn Trp Leu Gln Leu Met Leu Asn Trp Asp Pro Gln Gln Arg Gly
 275 280 285

Gly Pro Val Asp Leu Thr Leu Lys Gln Pro Arg Cys Phe Val Leu Met
 290 295 300

Asp His Ile Leu Asn Leu Lys Ile Val His Ile Leu Asn Met Thr Ser
 305 310 315 320

Ala Lys Ile Ile Ser Phe Leu Leu Pro Pro Asp Glu Ser Leu His Ser
 325 330 335

Leu Gln Ser Arg Ile Glu Arg Glu Thr Gly Ile Asn Thr Gly Ser Gln
 340 345 350

Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Ser Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala
355 360 365

Ser Gln Cys Val Leu Asp Gly Val Arg Gly Cys Asp Ser Tyr Met Val
370 375 380

Tyr Leu Phe Asp Lys Ser Lys Thr Val Tyr Glu Gly Pro Phe Ala Ser
385 390 395 400

Arg Ser Leu Ser Asp Cys Val Asn Tyr Ile Val Gln Asp Ser Lys Ile
405 410 415

Gln Leu Pro Ile Ile Gln Leu Arg Lys Val Trp Ala Glu Ala Val His
420 425 430

Tyr Val Ser Gly Leu Lys Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Phe Gln Gly Gln
435 440 445

Arg Ala Ala Met Leu Ser Leu Leu Arg Tyr Asn Ala Asn Leu Thr Lys
450 455 460

Met Lys Asn Thr Leu Ile Ser Ala Ser Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu
465 470 475 480

Glu Phe Phe His Lys Ser Ile Gln Leu Asp Leu Glu Arg Tyr Ser Glu
485 490 495

Gln Met Thr Tyr Gly Ile Ser Ser Glu Lys Met Leu Lys Ala Trp Lys
500 505 510

Glu Met Glu Glu Lys Ala Ile His Tyr Ala Glu Val Gly Val Ile Gly
515 520 525

Tyr Leu Glu Asp Gln Ile Met Ser Leu His Ala Glu Ile Met Glu Leu
530 535 540

Gln Lys Ser Pro Tyr Gly Arg Arg Gln Gly Asp Leu Met Glu Ser Leu

545

550

555

560

Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr Lys Gln Leu Lys His Arg Pro Ser
565 570 575

Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Met Val Lys Ile Ile Val His
580 585 590

Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val Leu Lys Glu Leu Phe Gly His Leu
595 600 605

Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln Lys Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys
610 615 620

Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Met
625 630 635 640

Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys Glu Ile Trp His Leu Leu Lys Ile
645 650 655

Ala Cys Thr Gln Ser Ser Ala Arg Ser Leu Val Gly Ser Ser Leu Glu
660 665 670

Gly Ala Val Thr Pro Gln Thr Ser Ala Trp Leu Pro Pro Thr Ser Ala
675 680 685

Glu His Asp His Ser Leu Ser Cys Val Val Thr Pro Gln Asp Gly Glu
690 695 700

Thr Ser Ala Gln Met Ile Glu Glu Asn Leu Asn Cys Leu Gly His Leu
705 710 715 720

Ser Thr Ile Ile His Glu Ala Asn Glu Glu Gln Gly Asn Ser Met Met
725 730 735

Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr Glu
740 745

<210> 26
<211> 1173
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Glu Glu Leu Ser Ala Asp Glu Ile Arg Arg Arg Arg Leu Ala Arg
1 5 10 15

Leu Ala Gly Gly Gln Thr Ser Gln Pro Thr Thr Pro Leu Thr Ser Pro
20 25 30

Gln Arg Glu Asn Pro Pro Gly Pro Pro Ile Ala Ala Ser Ala Pro Gly
35 40 45

Pro Ser Gln Ser Leu Gly Leu Asn Val His Asn Met Thr Pro Ala Thr
50 55 60

Ser Pro Ile Gly Ala Ser Gly Val Ala His Arg Ser Gln Ser Ser Glu
65 70 75 80

Gly Val Ser Ser Leu Ser Ser Pro Ser Asn Ser Leu Glu Thr Gln
85 90 95

Ser Gln Ser Leu Ser Arg Ser Gln Ser Met Asp Ile Asp Gly Val Ser
100 105 110

Cys Glu Lys Ser Met Ser Gln Val Asp Val Asp Ser Gly Ile Glu Asn
115 120 125

Met Glu Val Asp Glu Asn Asp Arg Arg Glu Lys Arg Ser Leu Ser Asp
130 135 140

Lys Glu Pro Ser Ser Gly Pro Glu Val Ser Glu Glu Gln Ala Leu Gln
145 150 155 160

Leu Val Cys Lys Ile Phe Arg Val Ser Trp Lys Asp Arg Asp Arg Asp
165 170 175

Val Ile Phe Leu Ser Ser Leu Ser Ala Gln Phe Lys Gln Asn Pro Lys
180 185 190

Glu Val Phe Ser Asp Phe Lys Asp Leu Ile Gly Gln Ile Leu Met Glu
195 200 205

Val Leu Met Met Ser Thr Gln Thr Arg Asp Glu Asn Pro Phe Ala Ser
210 215 220

Leu Thr Ala Thr Ser Gln Pro Ile Ala Ala Ala Ala Arg Ser Pro Asp
225 230 235 240

Arg Asn Leu Leu Leu Asn Thr Gly Ser Asn Pro Gly Thr Ser Pro Met
245 250 255

Phe Cys Ser Val Ala Ser Phe Gly Ala Ser Ser Leu Ser Ser Leu Gly
260 265 270

Ala Ser Gly Gly Ala Ser Asn Trp Asp Ser Tyr Ser Asp His Phe Thr
275 280 285

Ile Glu Thr Cys Lys Glu Thr Asp Met Leu Asn Tyr Leu Ile Glu Cys
290 295 300

Phe Asp Arg Val Gly Ile Glu Glu Lys Lys Ala Pro Lys Met Cys Ser
305 310 315 320

Gln Pro Ala Val Ser Gln Leu Leu Ser Asn Ile Arg Ser Gln Cys Ile
325 330 335

Ser His Thr Ala Leu Val Leu Gln Gly Ser Leu Thr Gln Pro Arg Ser
340 345 350

Leu Gln Gln Pro Ser Phe Leu Val Pro Tyr Met Leu Cys Arg Asn Leu
355 360 365

Pro Tyr Gly Phe Ile Gln Glu Leu Val Arg Thr Thr His Gln Asp Glu
370 375 380

Glu Val Phe Lys Gln Ile Phe Ile Pro Ile Leu Gln Gly Leu Ala Leu
385 390 395 400

Ala Ala Lys Glu Cys Ser Leu Asp Ser Asp Tyr Phe Lys Tyr Pro Leu
405 410 415

Met Ala Leu Gly Glu Leu Cys Glu Thr Lys Phe Gly Lys Thr His Pro
420 425 430

Val Cys Asn Leu Val Ala Ser Leu Arg Leu Trp Leu Pro Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Cys Gly Arg Glu Leu Gln Arg Leu Ser Tyr Leu Gly Ala
450 455 460

Phe Phe Ser Phe Ser Val Phe Ala Glu Asp Asp Val Lys Val Val Glu
465 470 475 480

Lys Tyr Phe Ser Gly Pro Ala Ile Thr Leu Glu Asn Thr Arg Val Val
485 490 495

Ser Gln Ser Leu Gln His Tyr Leu Glu Leu Gly Arg Gln Glu Leu Phe
500 505 510

Lys Ile Leu His Ser Ile Leu Leu Asn Gly Glu Thr Arg Glu Ala Ala
515 520 525

Leu Ser Tyr Met Ala Ala Val Val Asn Ala Asn Met Lys Lys Ala Gln
530 535 540

Met Gln Thr Asp Asp Arg Leu Val Ser Thr Asp Gly Phe Met Leu Asn
545 550 555 560

Phe Leu Trp Val Leu Gln Gln Leu Ser Thr Lys Ile Lys Leu Glu Thr
565 570 575

Val Asp Pro Thr Tyr Ile Phe His Pro Arg Cys Arg Ile Thr Leu Pro
580 585 590

Asn Asp Glu Thr Arg Val Asn Ala Thr Met Glu Asp Val Asn Asp Trp
595 600 605

Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Asp Gln Pro Pro Phe Ser Glu Pro Lys Phe
610 615 620

Pro Thr Glu Cys Phe Phe Leu Thr Leu His Ala His His Leu Ser Ile
625 630 635 640

Leu Pro Ser Cys Arg Arg Tyr Ile Arg Arg Leu Arg Ala Ile Arg Glu
645 650 655

Leu Asn Arg Thr Val Glu Asp Leu Lys Asn Asn Glu Ser Gln Trp Lys
660 665 670

Asp Ser Pro Leu Ala Thr Arg His Arg Glu Met Leu Lys Arg Cys Lys
675 680 685

Thr Gln Leu Lys Lys Leu Val Arg Cys Lys Ala Cys Ala Asp Ala Gly
690 695 700

Leu Leu Asp Glu Ser Phe Leu Arg Arg Cys Leu Asn Phe Tyr Gly Leu
705 710 715 720

Leu Ile Gln Leu Leu Arg Ile Leu Asp Pro Ala Tyr Pro Asp Ile
725 730 735

Thr Leu Pro Leu Asn Ser Asp Val Pro Lys Val Phe Ala Ala Leu Pro
740 745 750

Glu Phe Tyr Val Glu Asp Val Ala Glu Phe Leu Phe Phe Ile Val Gln
755 760 765

Tyr Ser Pro Gln Ala Leu Tyr Glu Pro Cys Thr Gln Asp Ile Val Met
770 775 780

Phe Leu Val Val Met Leu Cys Asn Gln Asn Tyr Ile Arg Asn Pro Tyr
785 790 795 800

Leu Val Ala Lys Leu Val Glu Val Met Phe Met Thr Asn Pro Ala Val
805 810 815

Gln Pro Arg Thr Gln Lys Phe Phe Glu Met Ile Glu Asn His Pro Leu
820 825 830

Ser Thr Lys Leu Leu Val Pro Ser Leu Met Lys Phe Tyr Thr Asp Val
835 840 845

Glu His Thr Gly Ala Thr Ser Glu Phe Tyr Asp Lys Phe Thr Ile Arg
850 855 860

Tyr His Ile Ser Thr Ile Phe Lys Ser Leu Trp Gln Asn Ile Ala His
865 870 875 880

His Gly Thr Phe Met Glu Glu Phe Asn Ser Gly Lys Gln Phe Val Arg
885 890 895

Tyr Ile Asn Met Leu Ile Asn Asp Thr Thr Phe Leu Leu Asp Glu Ser
900 905 910

Leu Glu Ser Leu Lys Arg Ile His Glu Val Gln Glu Glu Met Lys Asn
915 920 925

Lys Glu Gln Trp Asp Gln Leu Pro Arg Asp Gln Gln Gln Ala Arg Gln
930 935 940

Ser Gln Leu Ala Gln Asp Glu Arg Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Leu
945 950 955 960

Ala Thr Glu Thr Val Asp Met Phe His Ile Leu Thr Lys Gln Val Gln
965 970 975

Lys Pro Phe Leu Arg Pro Glu Leu Gly Pro Arg Leu Ala Ala Met Leu
980 985 990

Asn Phe Asn Leu Gln Gln Leu Cys Gly Pro Lys Cys Arg Asp Leu Lys
995 1000 1005

Val Glu Asn Pro Glu Lys Tyr Gly Phe Glu Pro Lys Lys Leu Leu
1010 1015 1020

Asp Gln Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Gln Leu Asp Cys Ala Arg Phe
1025 1030 1035

Ala Lys Ala Ile Ala Asp Asp Gln Arg Ser Tyr Ser Lys Glu Leu
1040 1045 1050

Phe Glu Glu Val Ile Ser Lys Met Arg Lys Ala Gly Ile Lys Ser
1055 1060 1065

Thr Ile Ala Ile Glu Lys Phe Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Glu
1070 1075 1080

Glut Ile Val Ala Lys Asn Ala Arg Ala Glu Ile Asp Tyr Ser Asp
1085 1090 1095

Ala Pro Asp Glu Phe Arg Asp Pro Leu Met Asp Thr Leu Met Thr
1100 1105 1110

Asp Pro Val Arg Leu Pro Ser Gly Thr Ile Met Asp Arg Ser Ile
1115 1120 1125

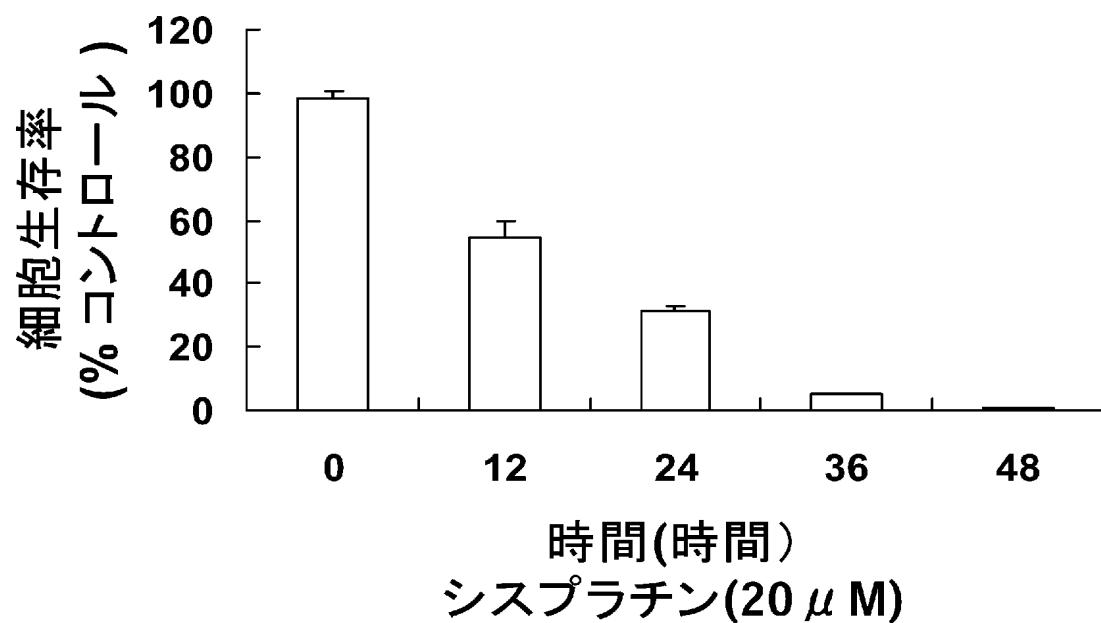
Ile Leu Arg His Leu Leu Asn Ser Pro Thr Asp Pro Phe Asn Arg
1130 1135 1140

Gln Thr Leu Thr Glu Ser Met Leu Glu Pro Val Pro Glu Leu Lys
1145 1150 1155

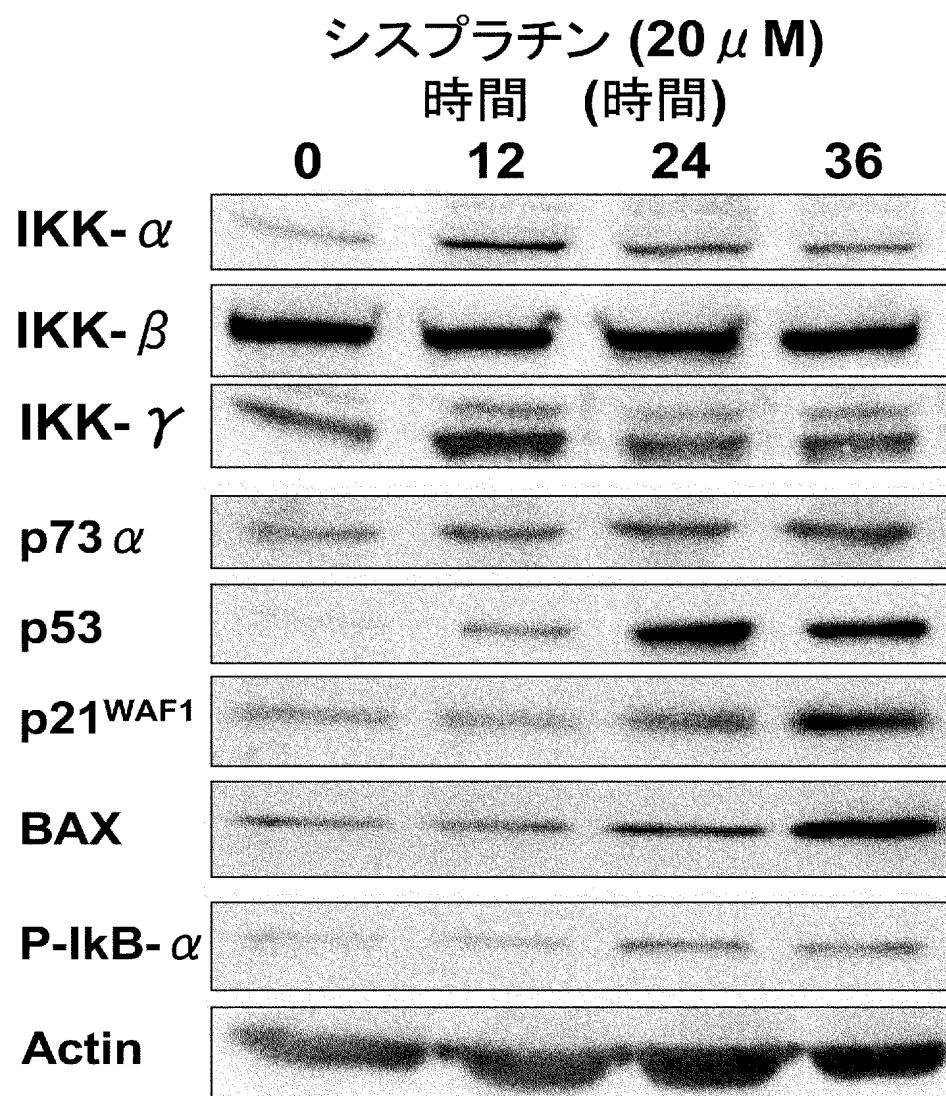
Gl u Gln Ile Gln Ala Trp Met Arg Glu Lys Gln Asn Ser Asp His
1160 1165 1170

【書類名】 図面

【図 1】



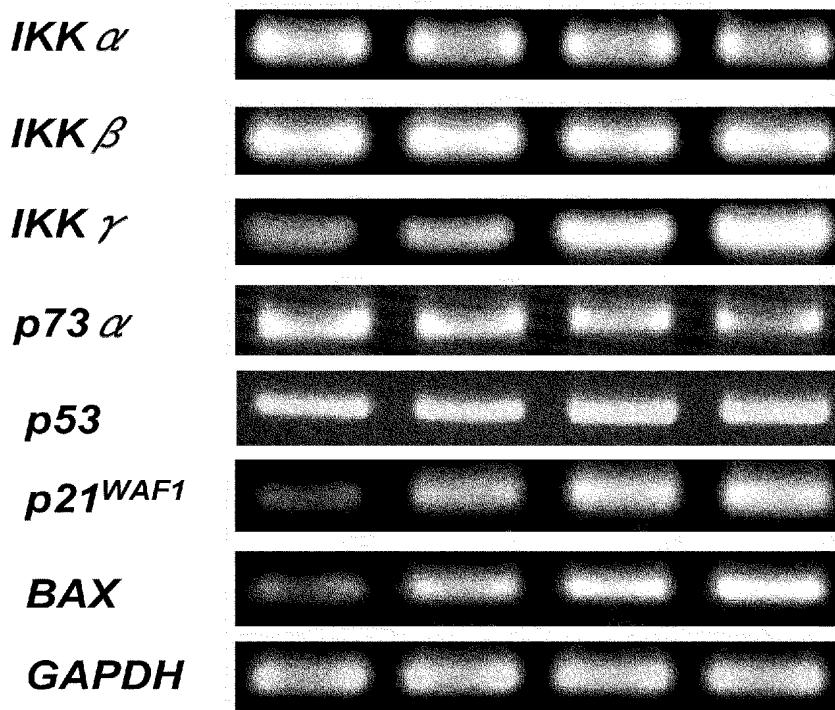
【図 2】



シスプラチン (20 μ M)

時間(時間)

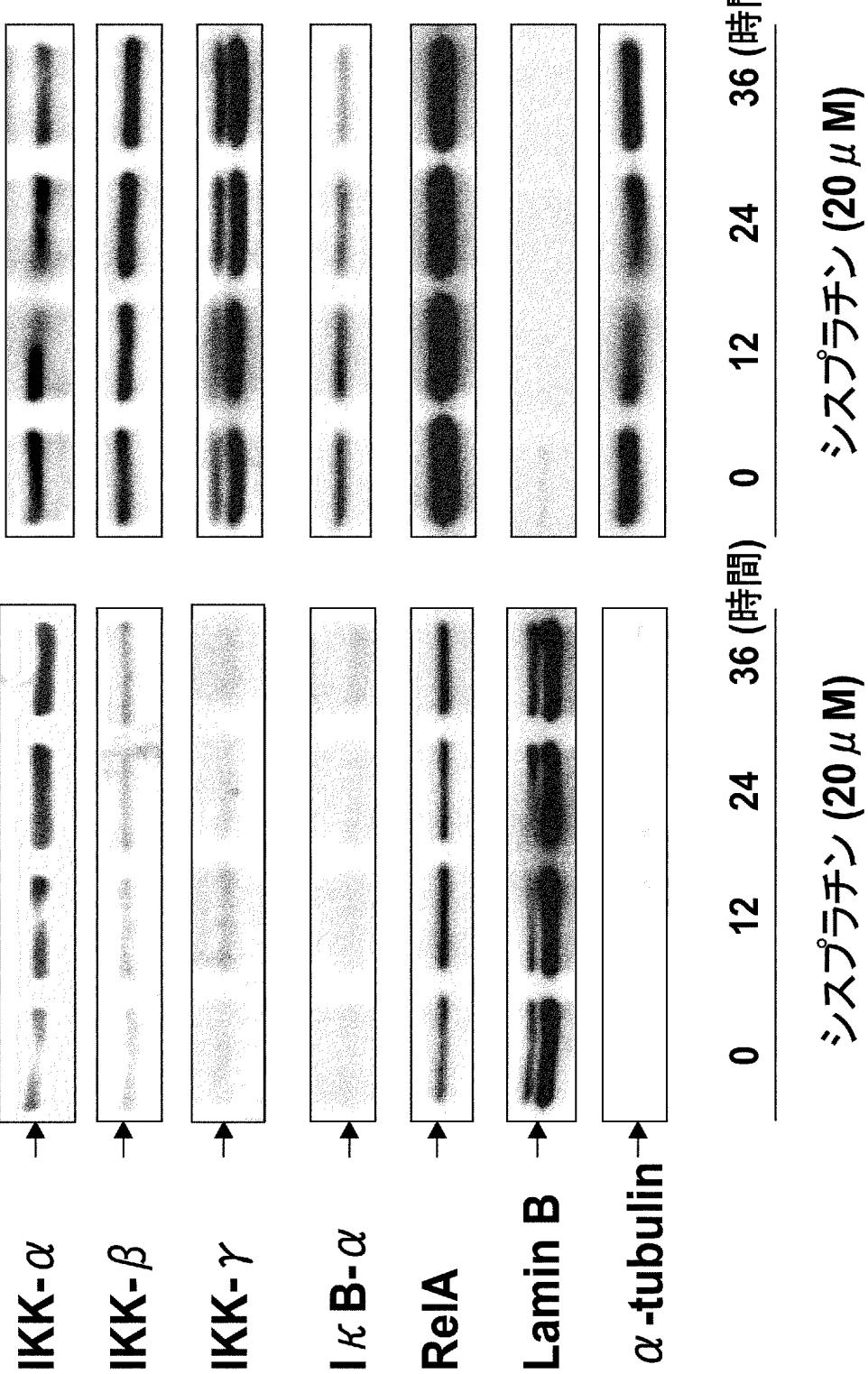
0 12 24 36

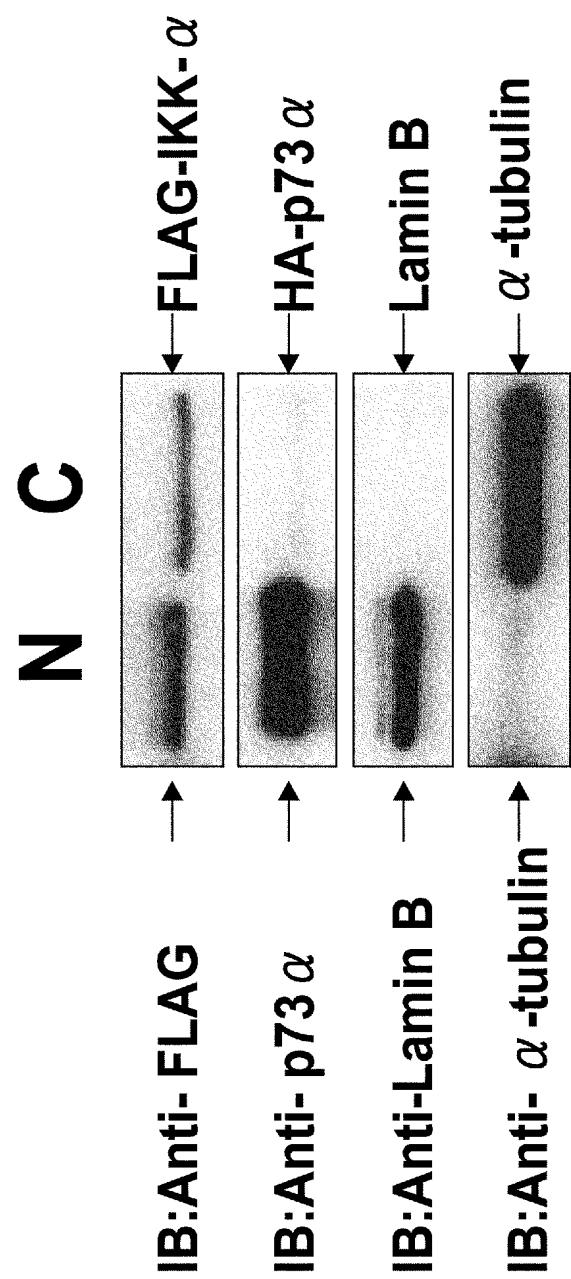


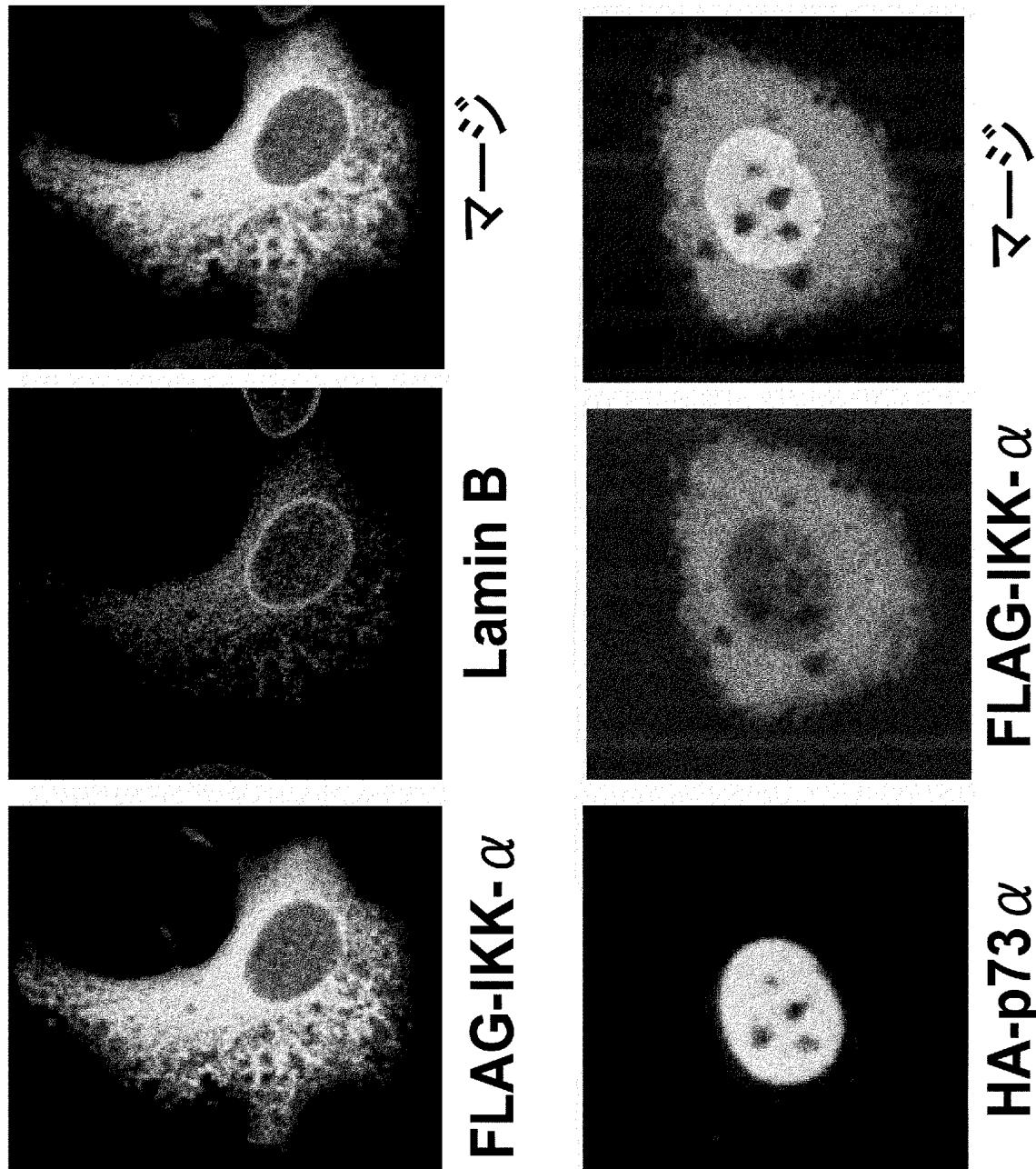
【図 4】

C

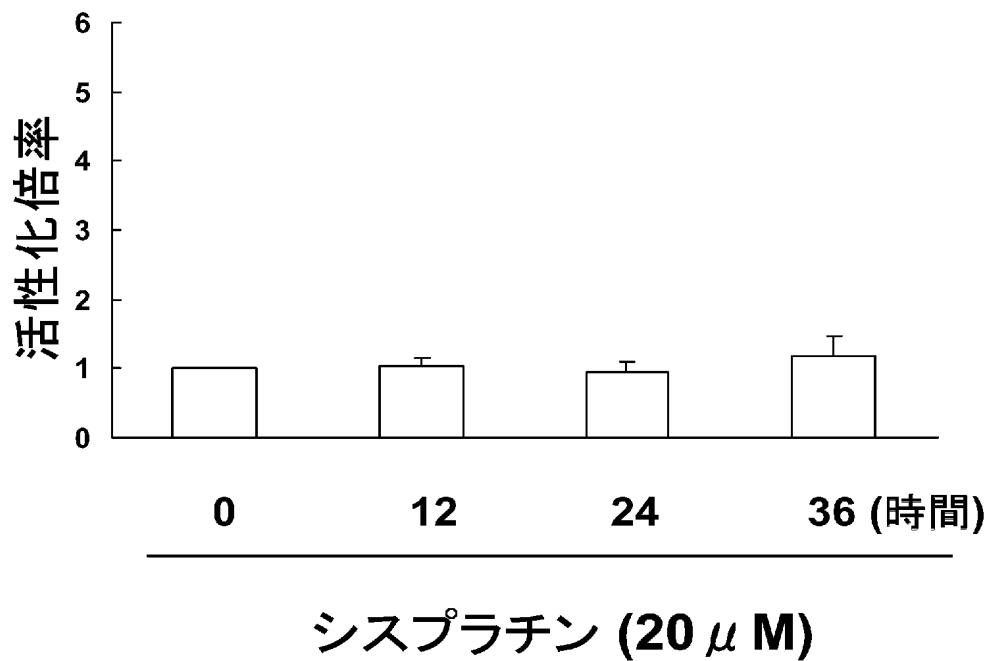
N



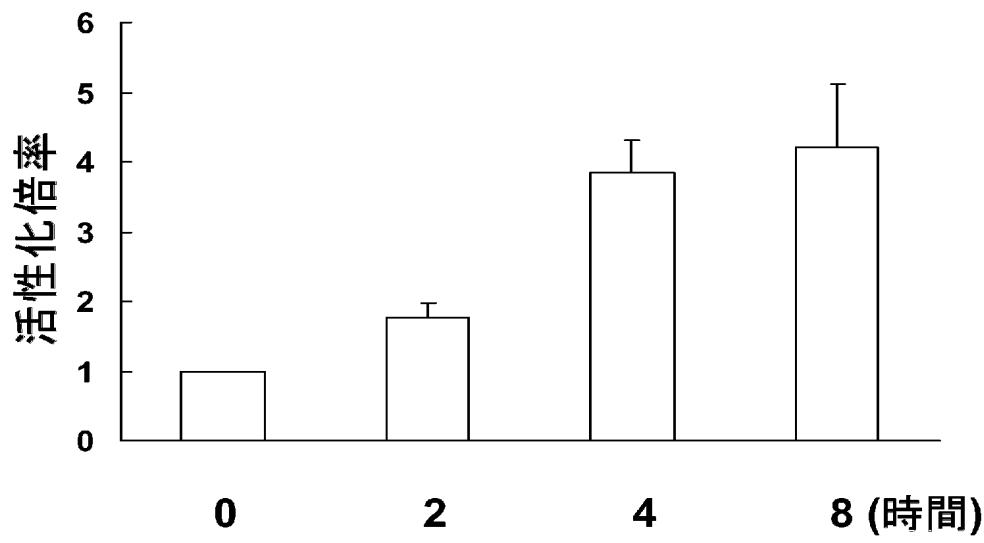




U2OS

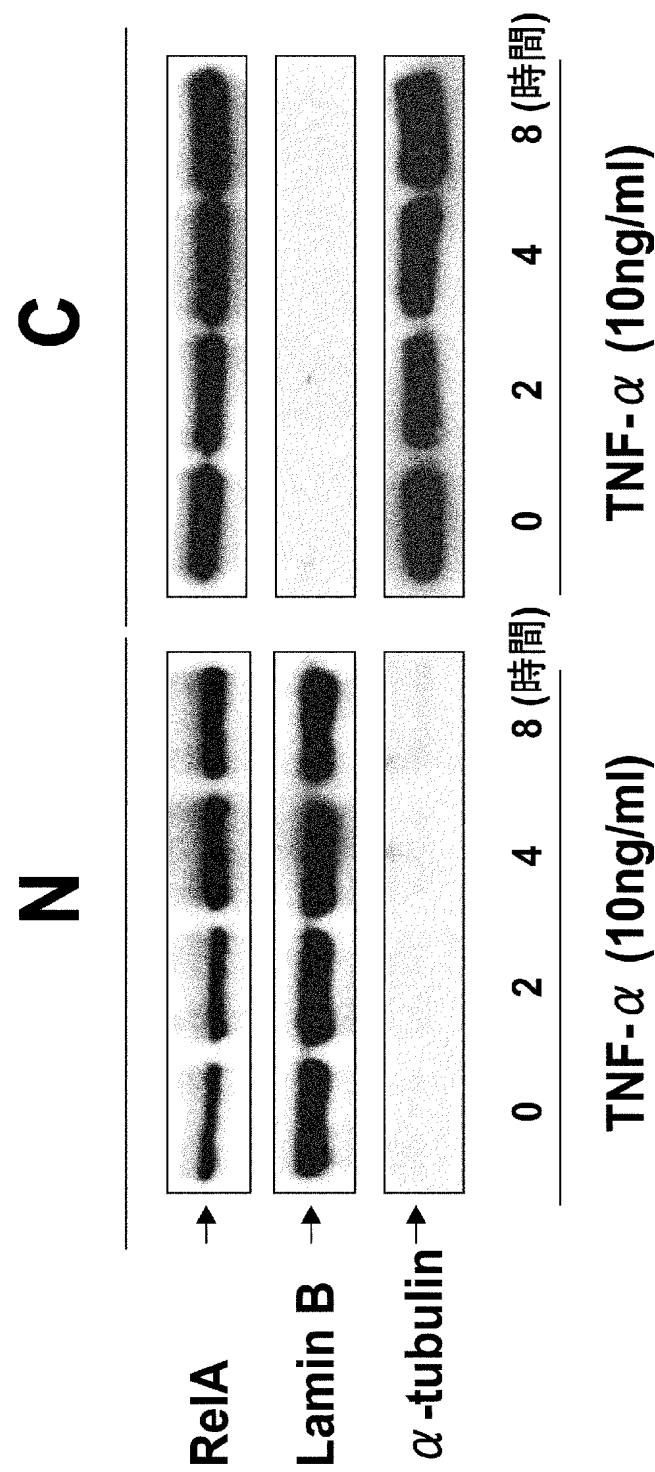


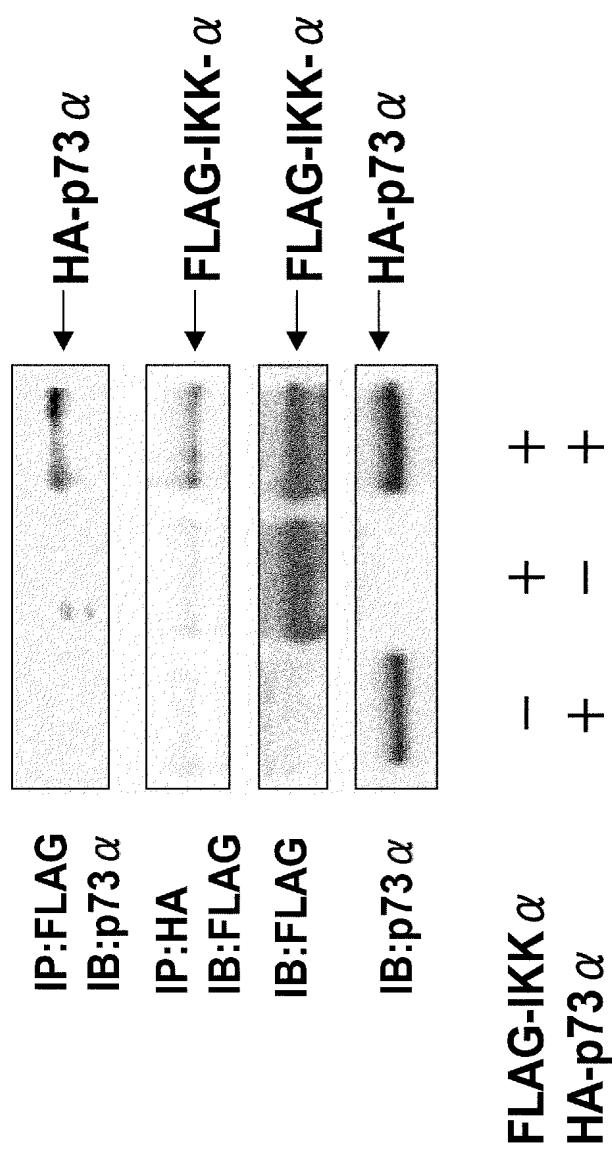
L929



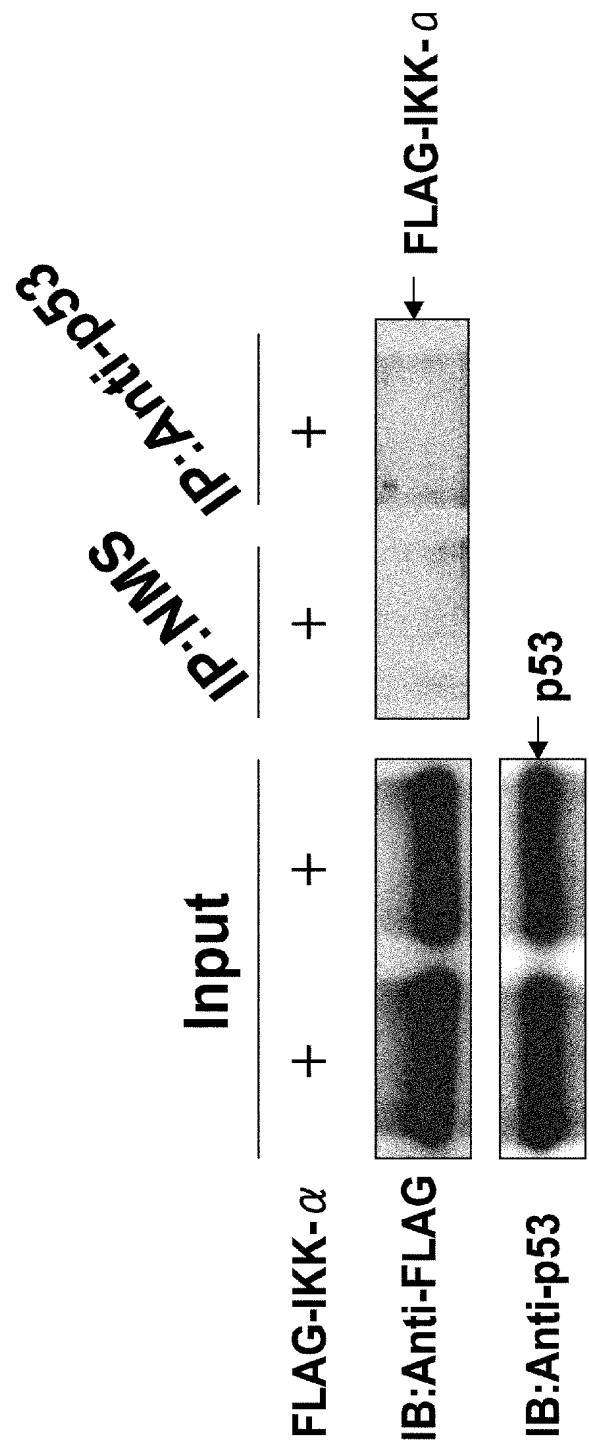
$\text{TNF-}\alpha$ (10ng/ml)

図9】

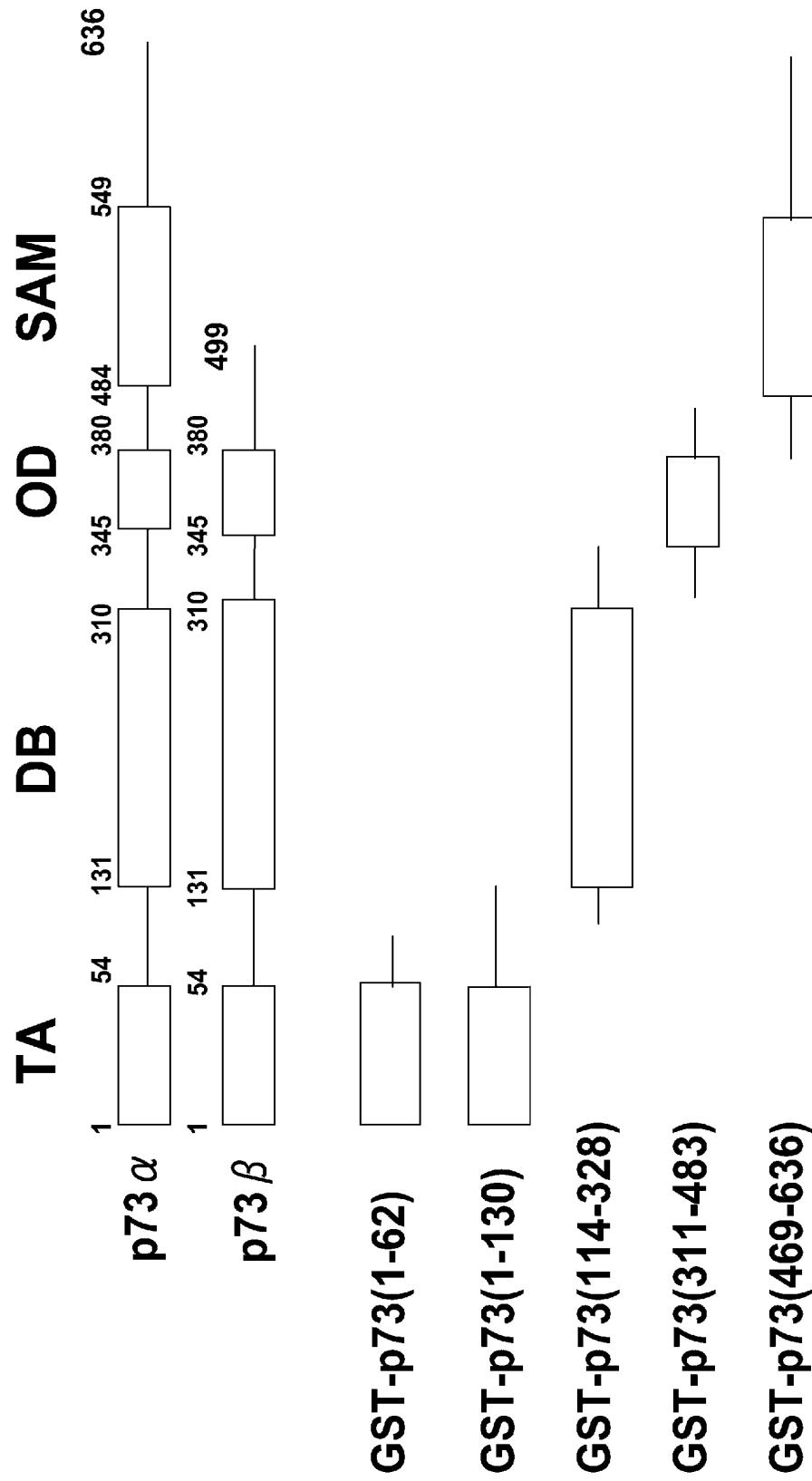




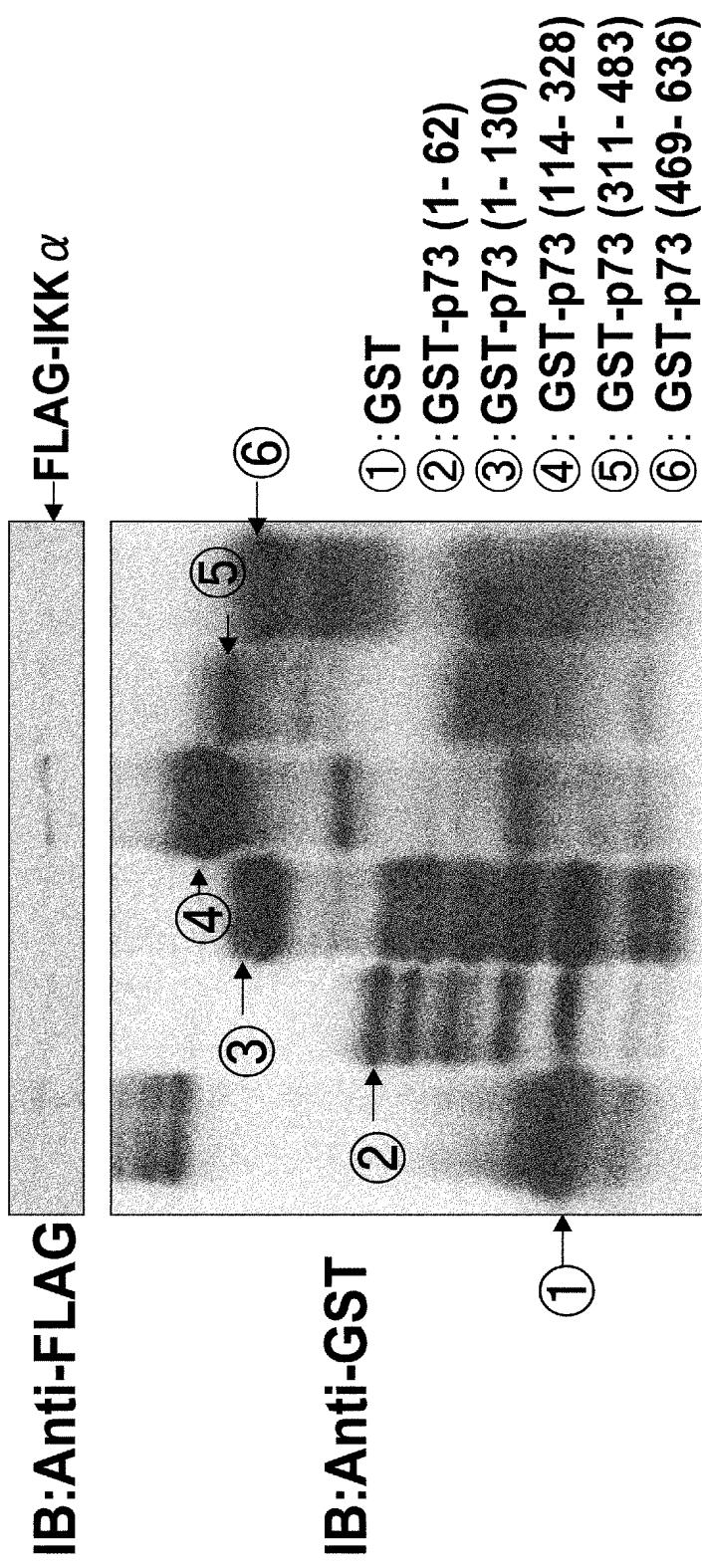
【図 1-1】

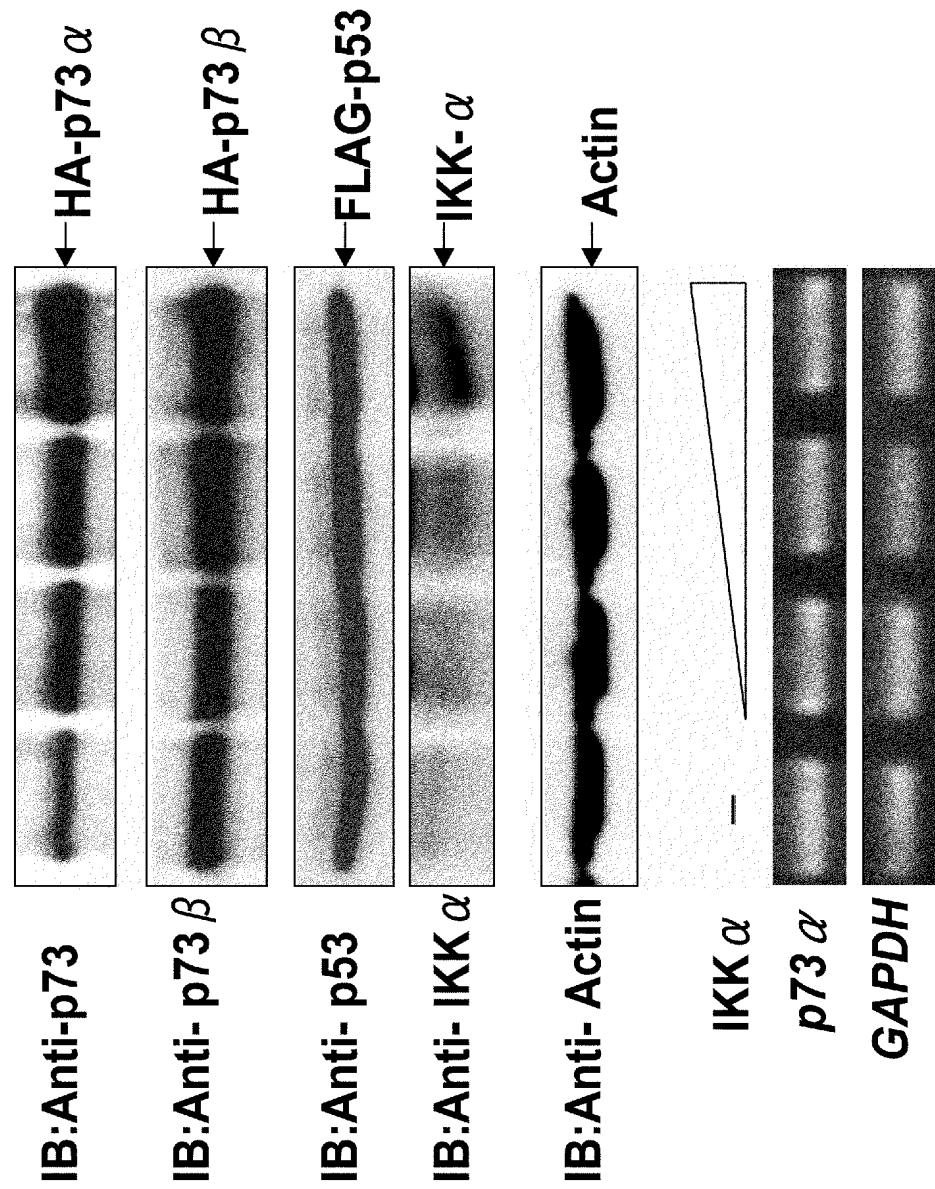


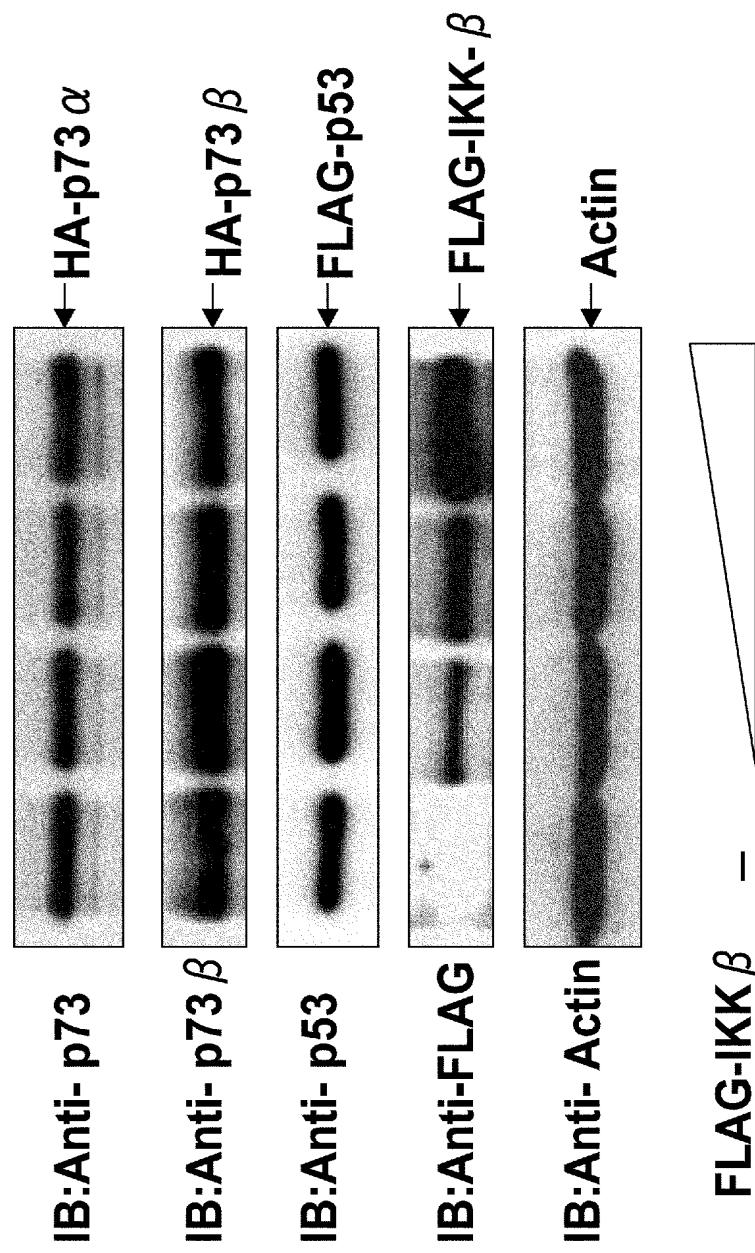
【図 1 2】



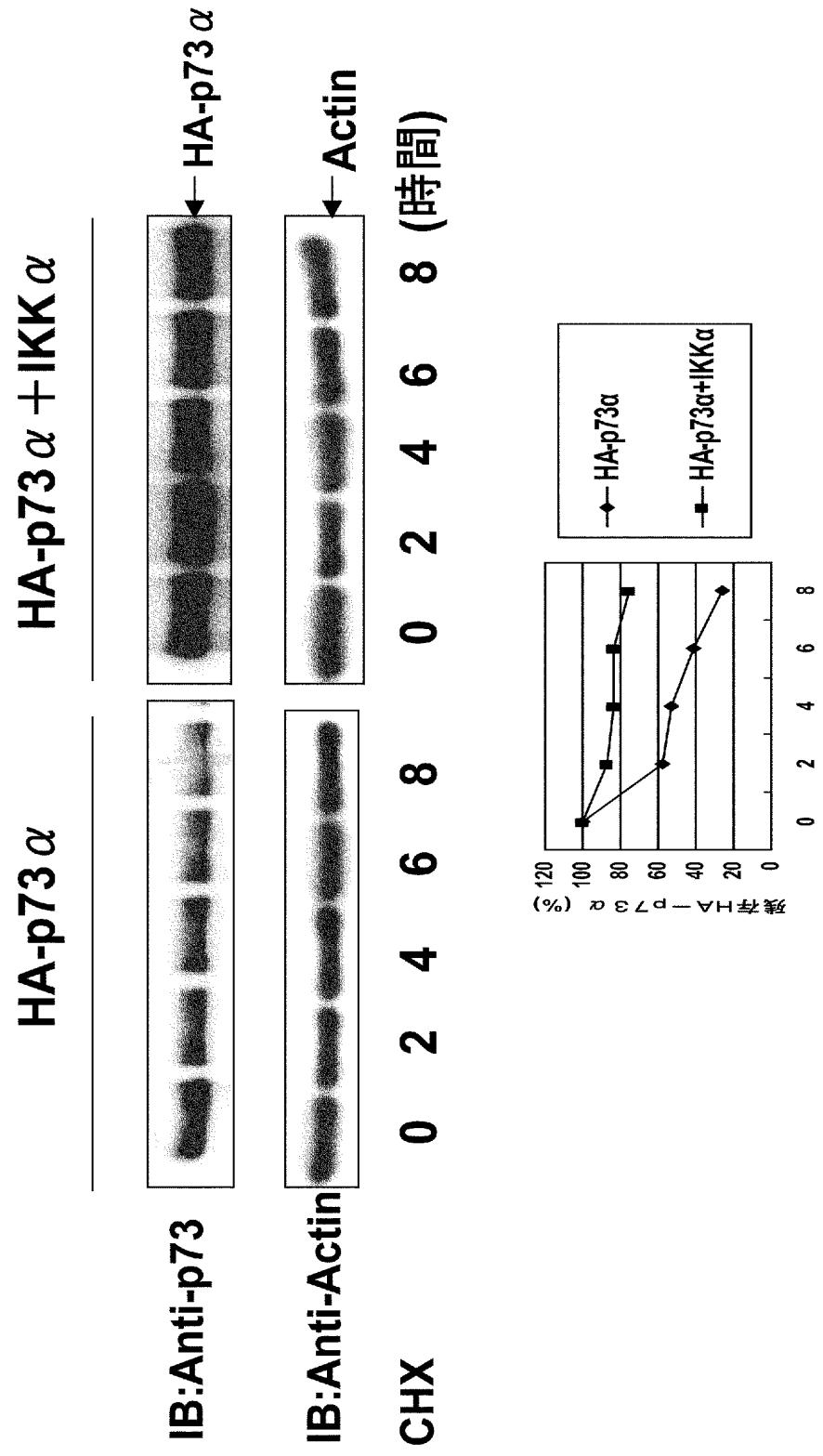
【図 1-3】

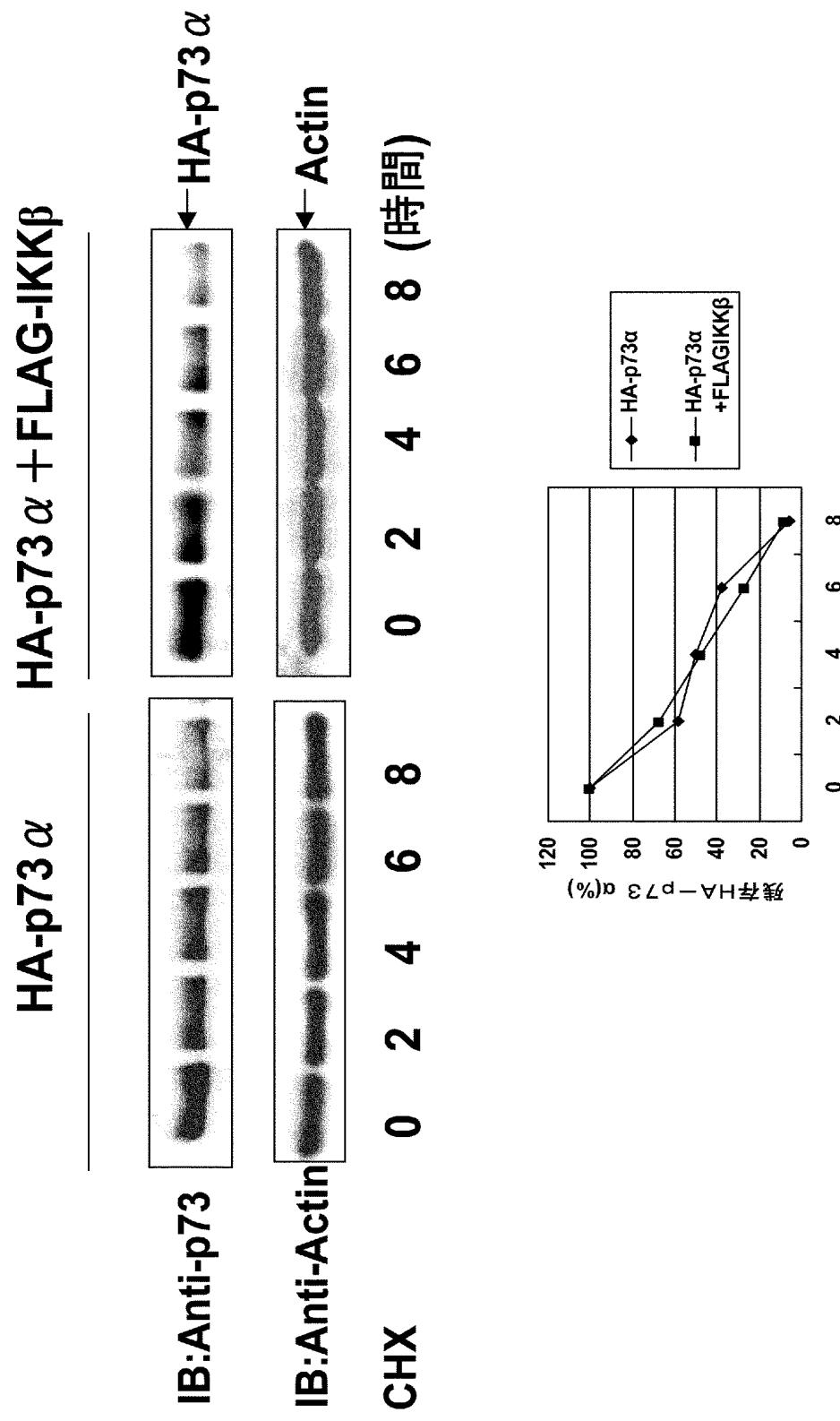




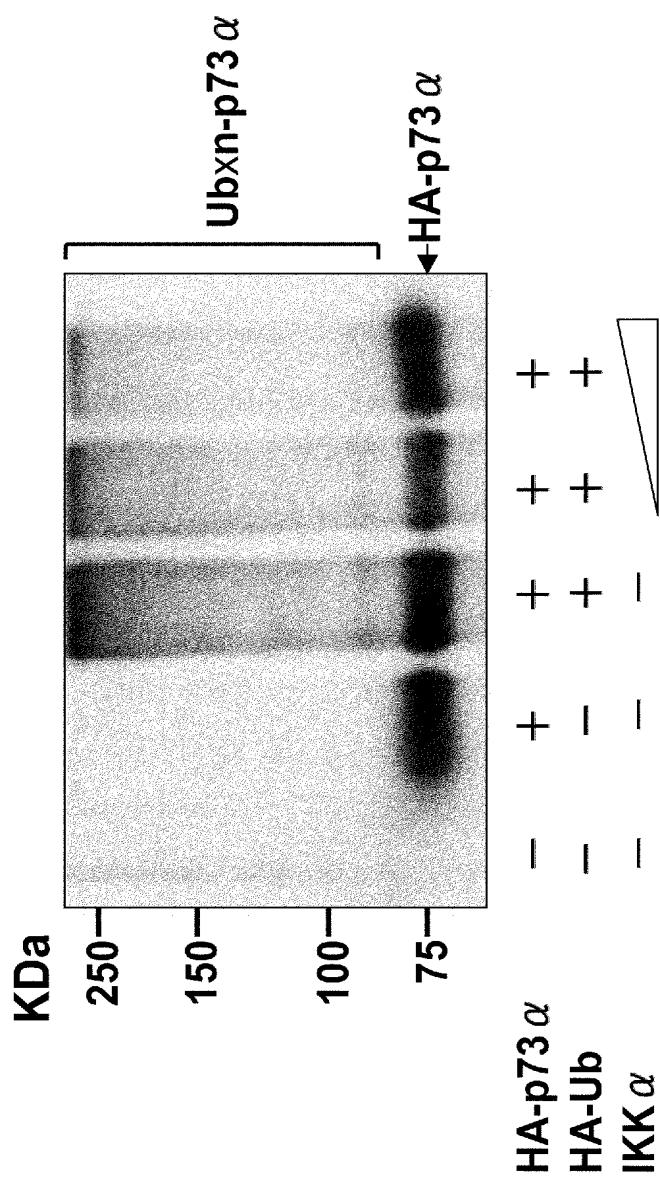


【図 1-6】

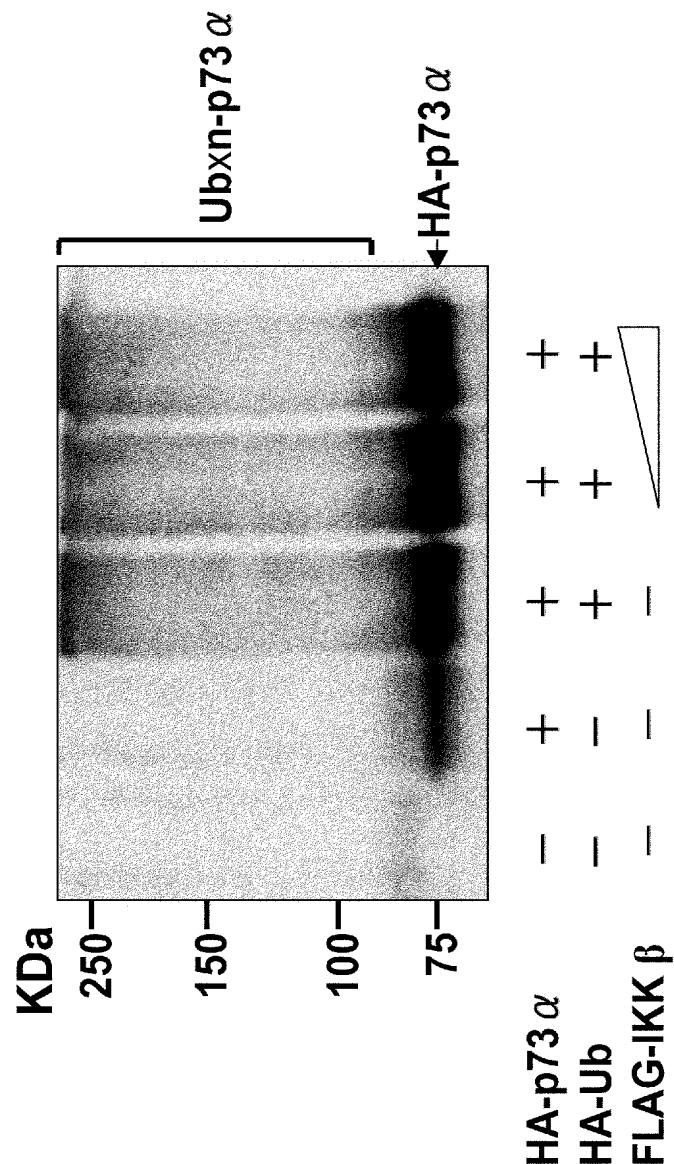




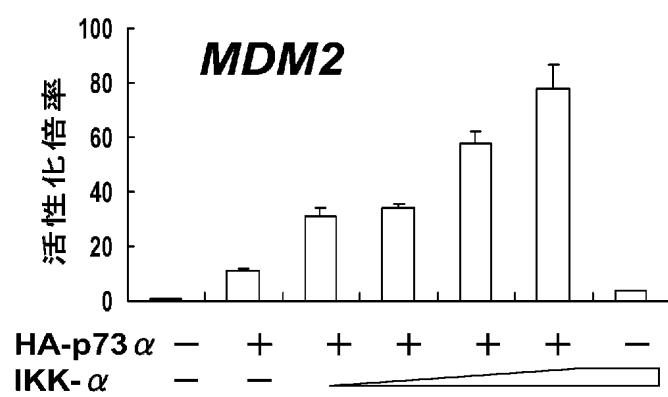
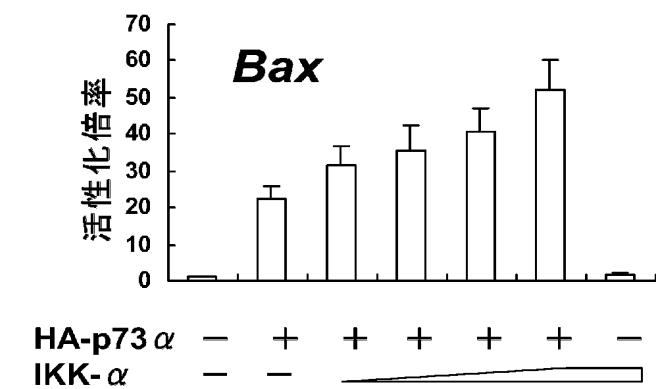
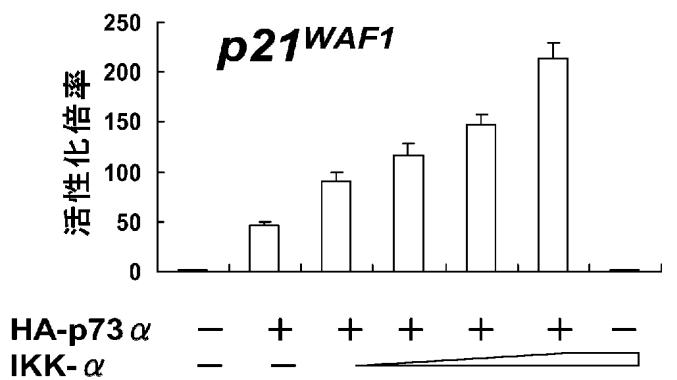
【図 1-8】



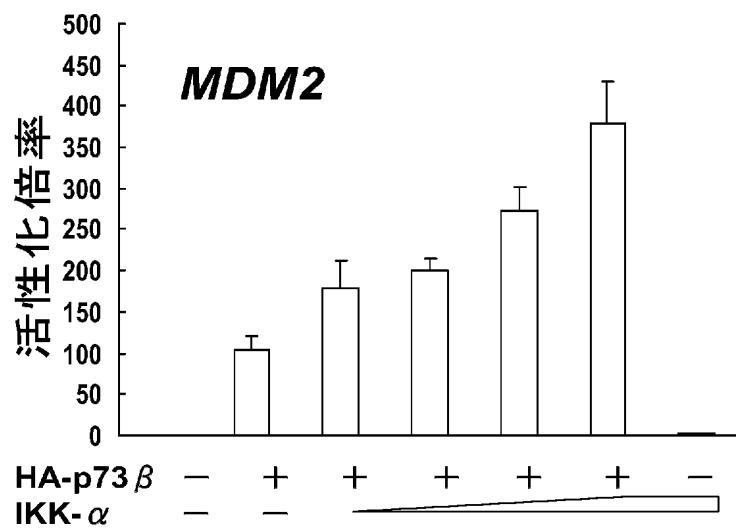
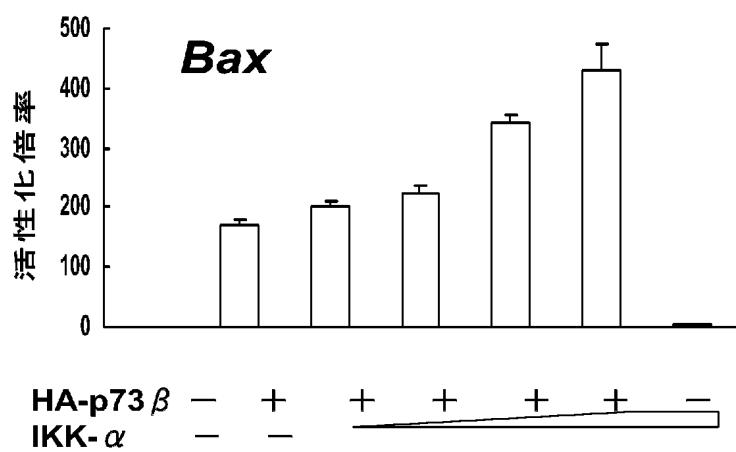
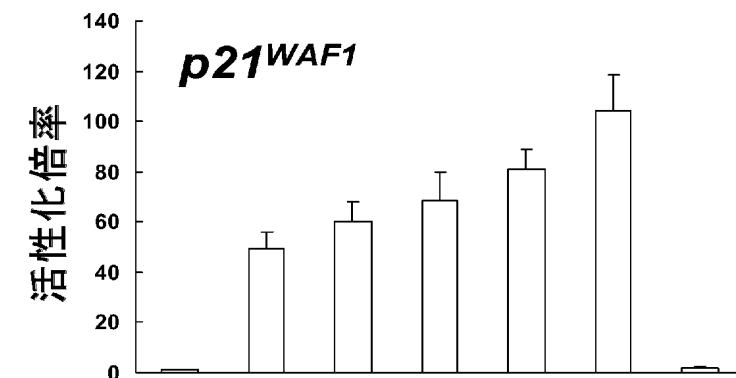
【図 1 9】



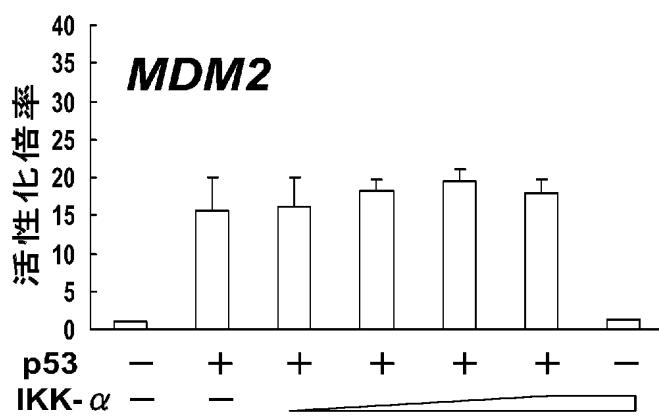
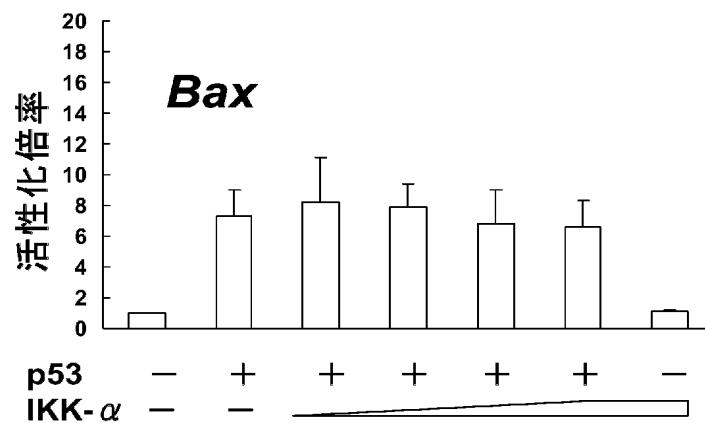
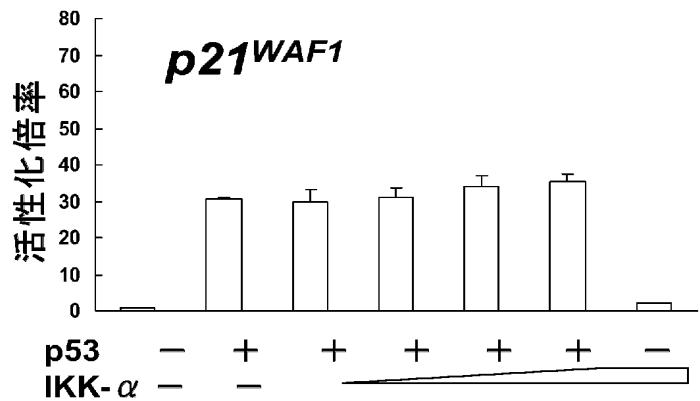
【図 20】



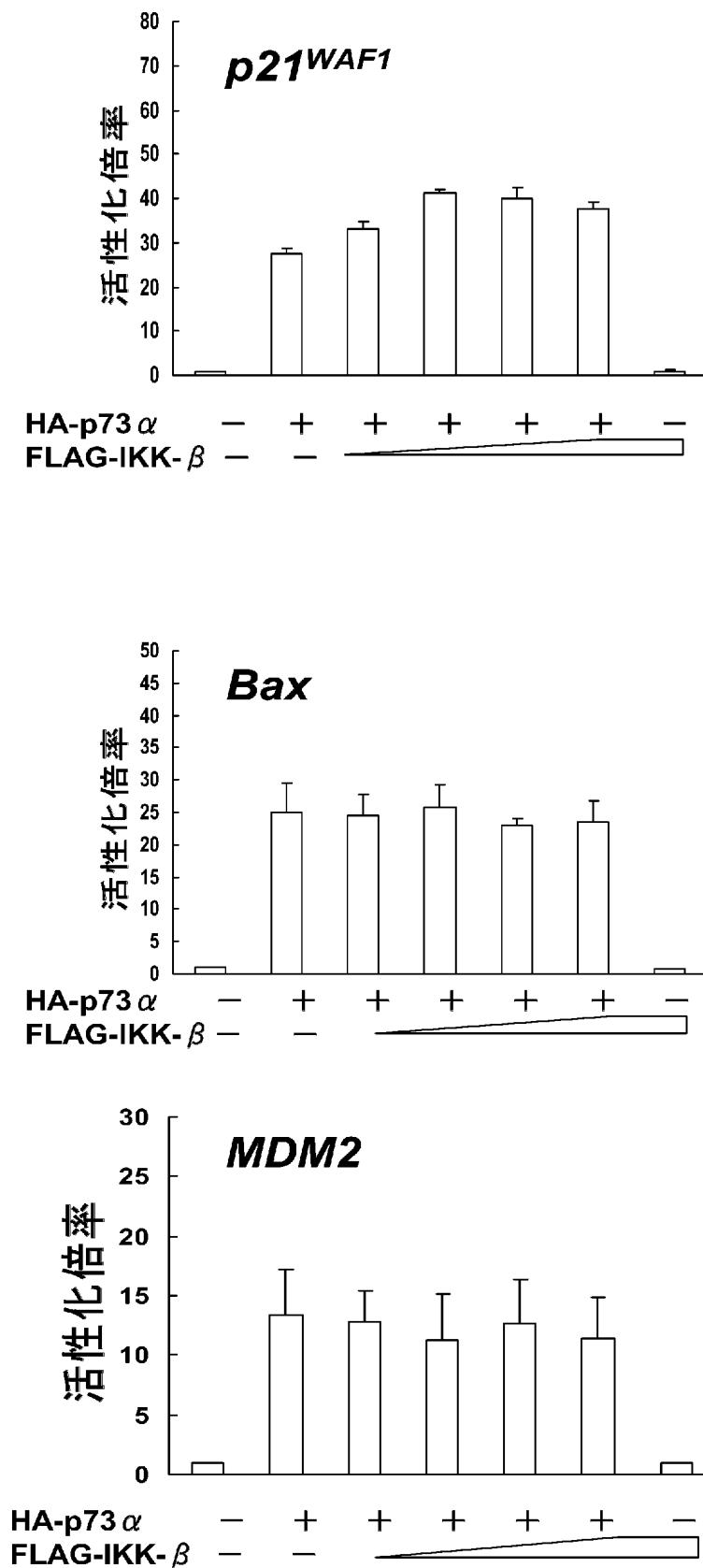
【図 2 1】



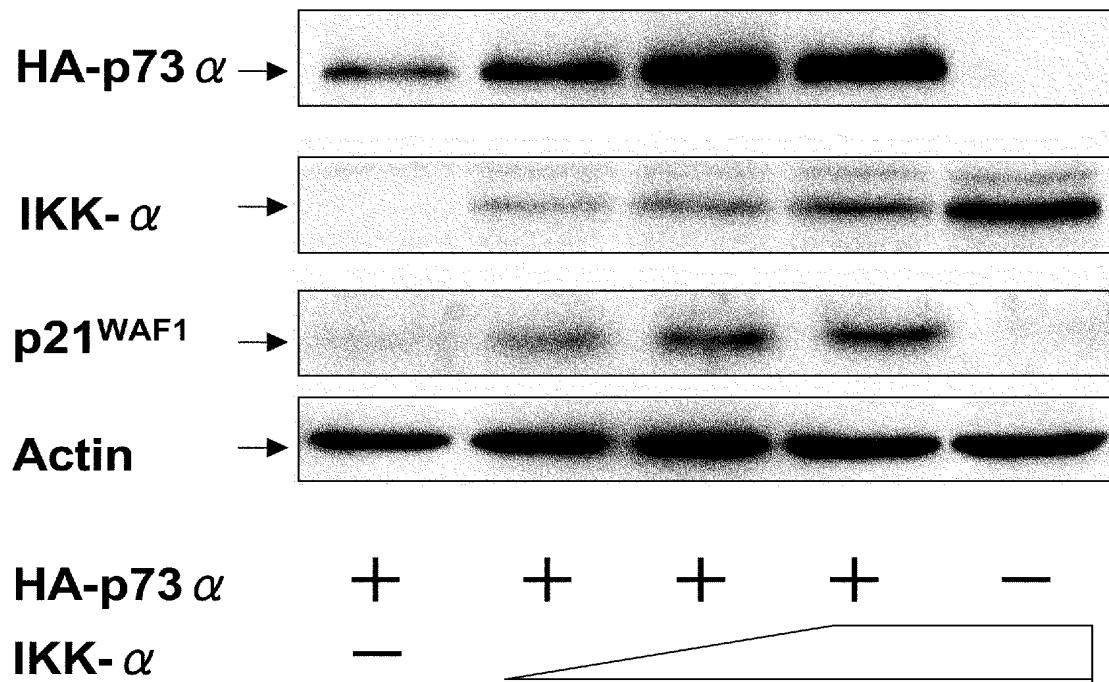
【図 2 2】



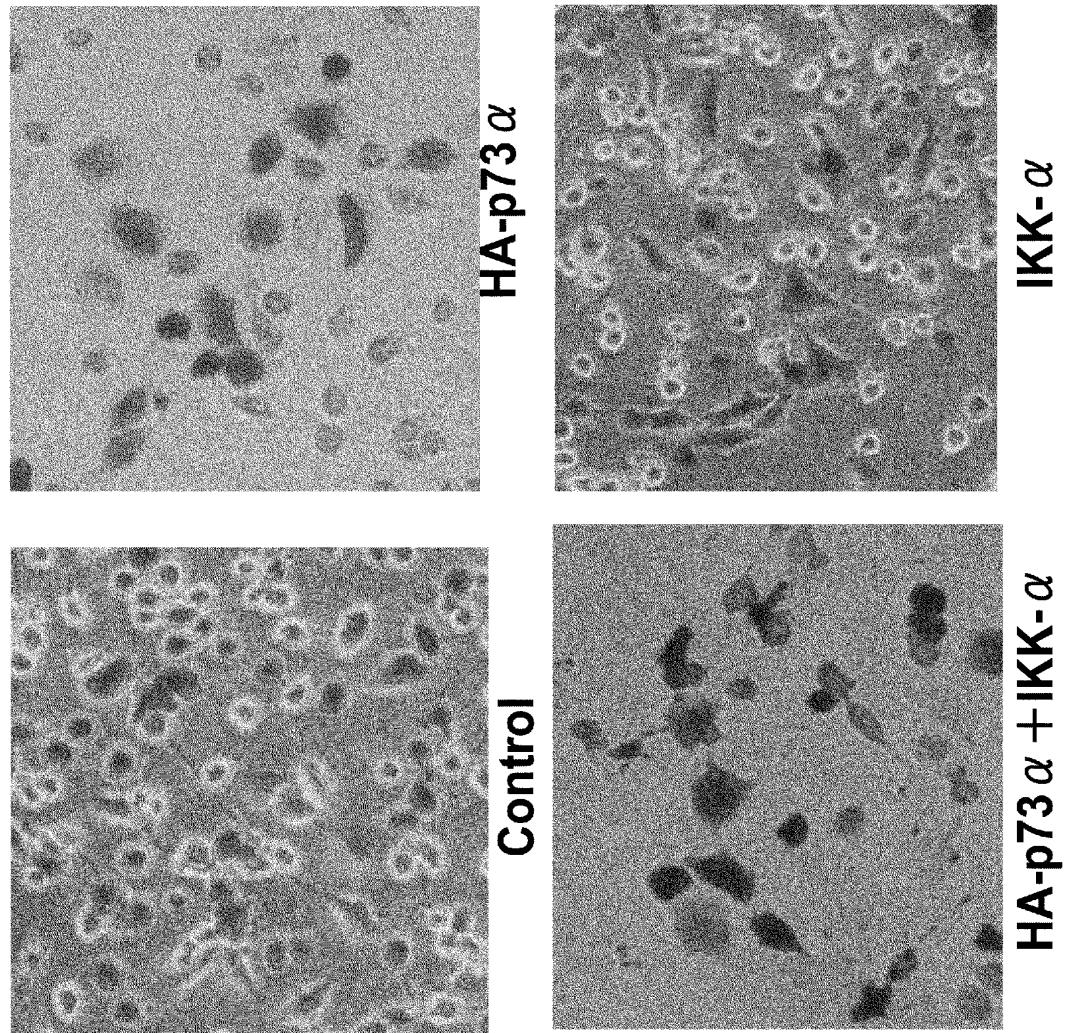
【図 2 3】



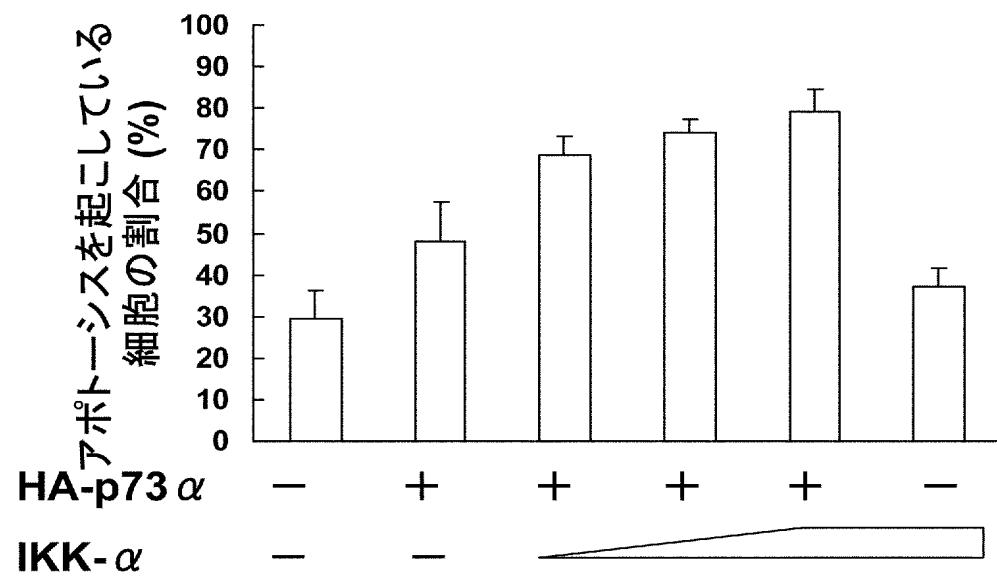
【図 2-4】



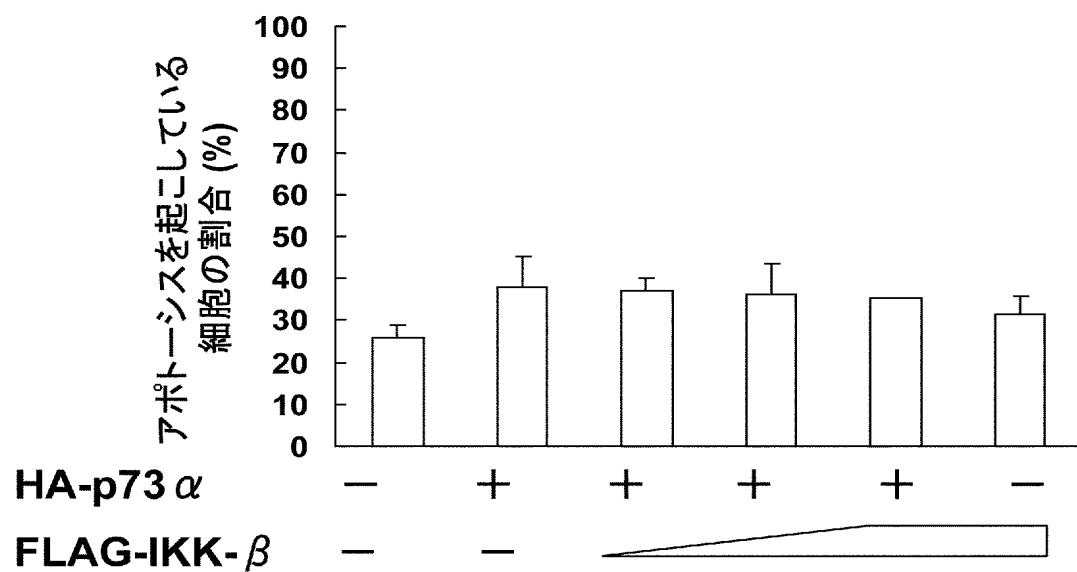
【図 25】

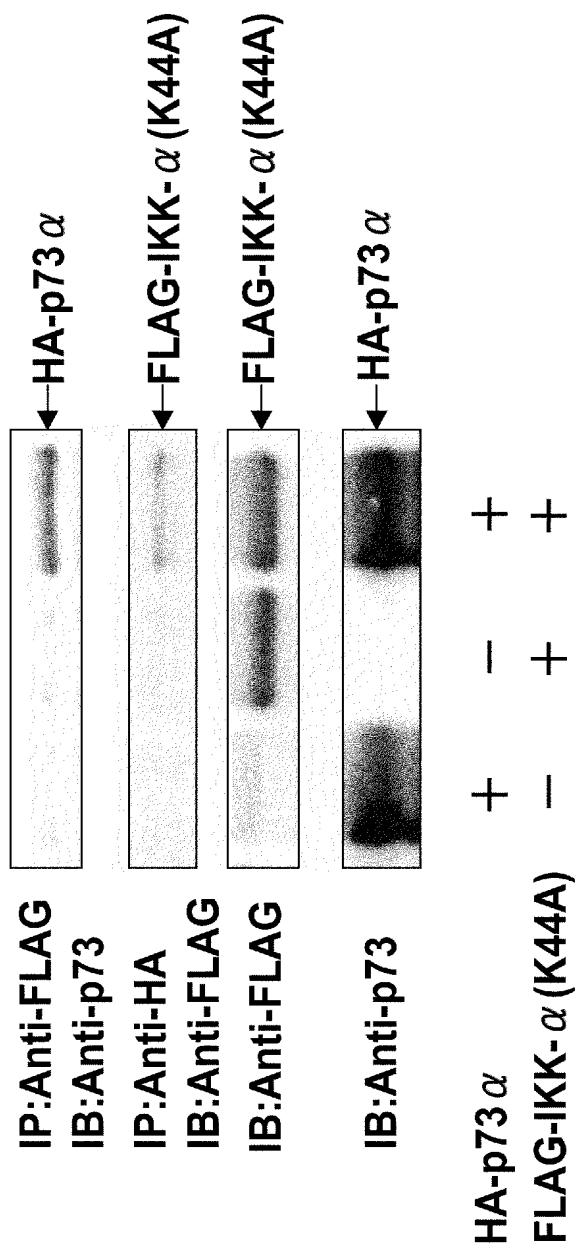


【図 2 6】

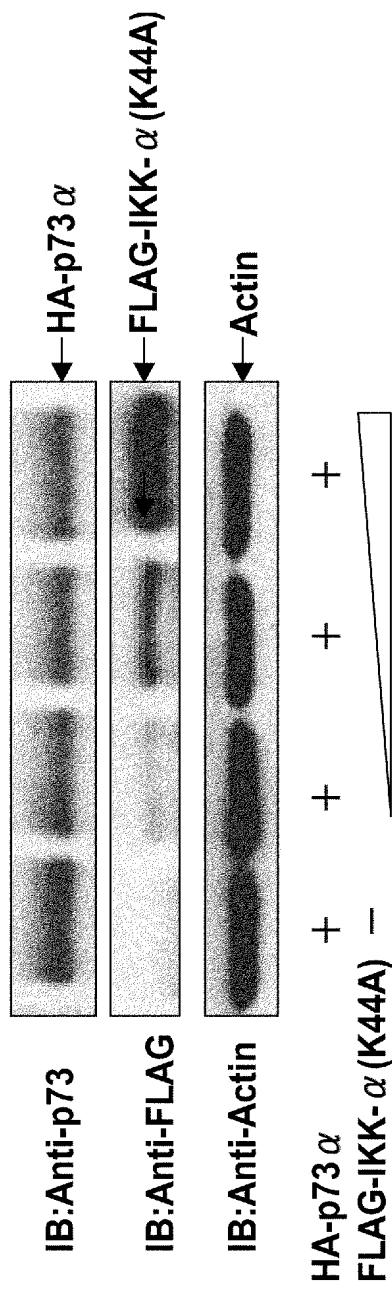


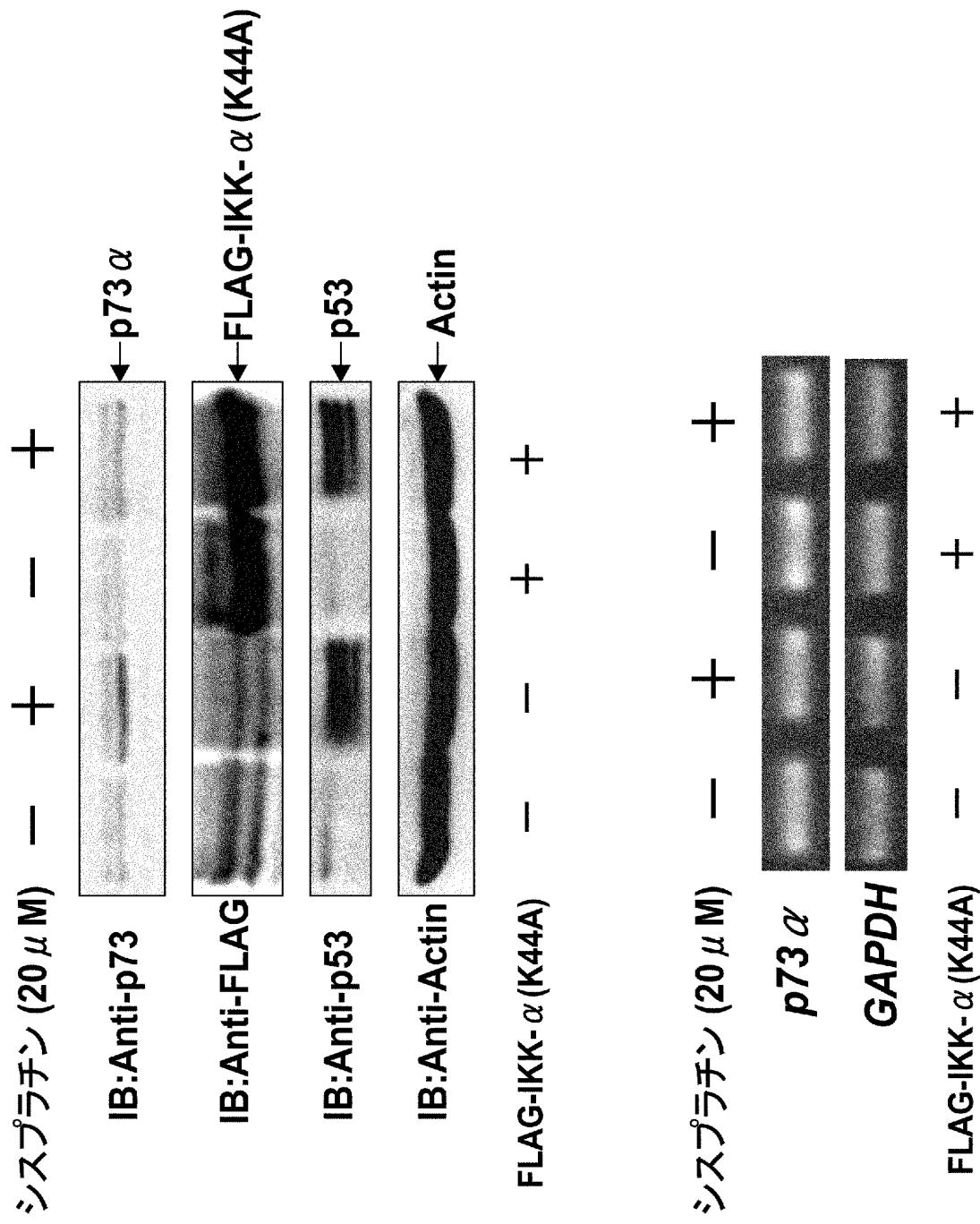
【図 27】



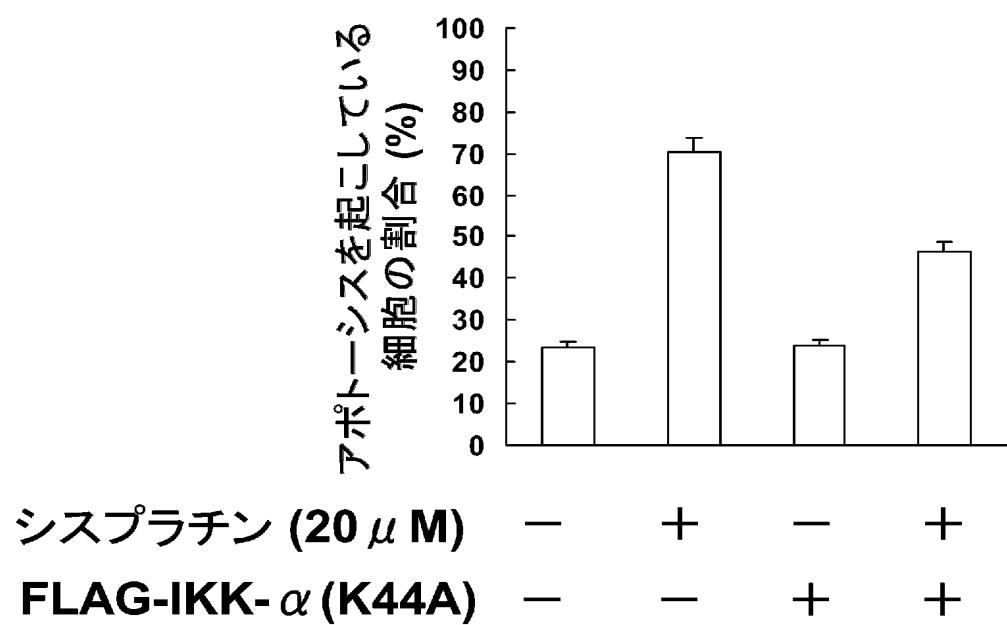


【図 2 9】

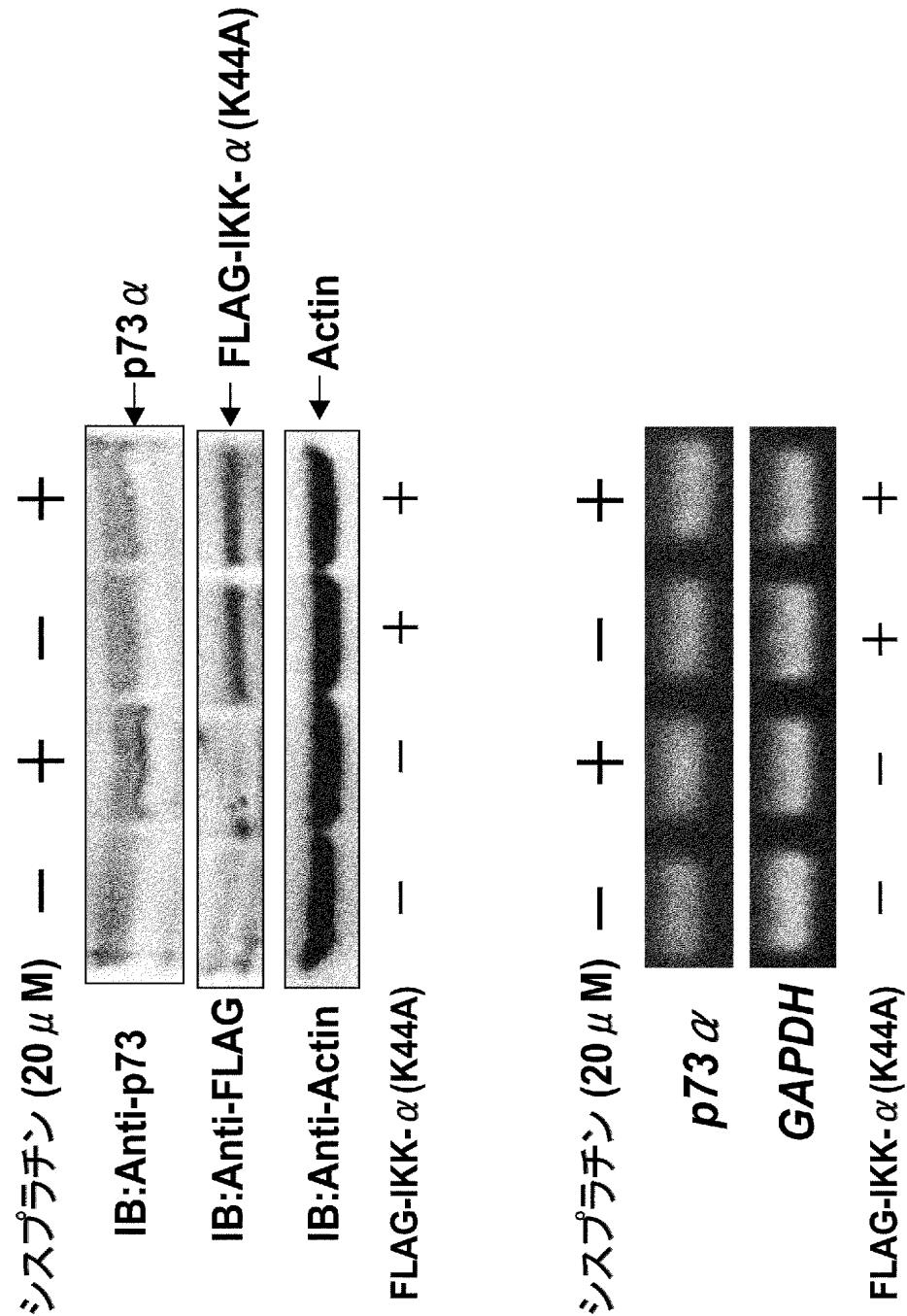




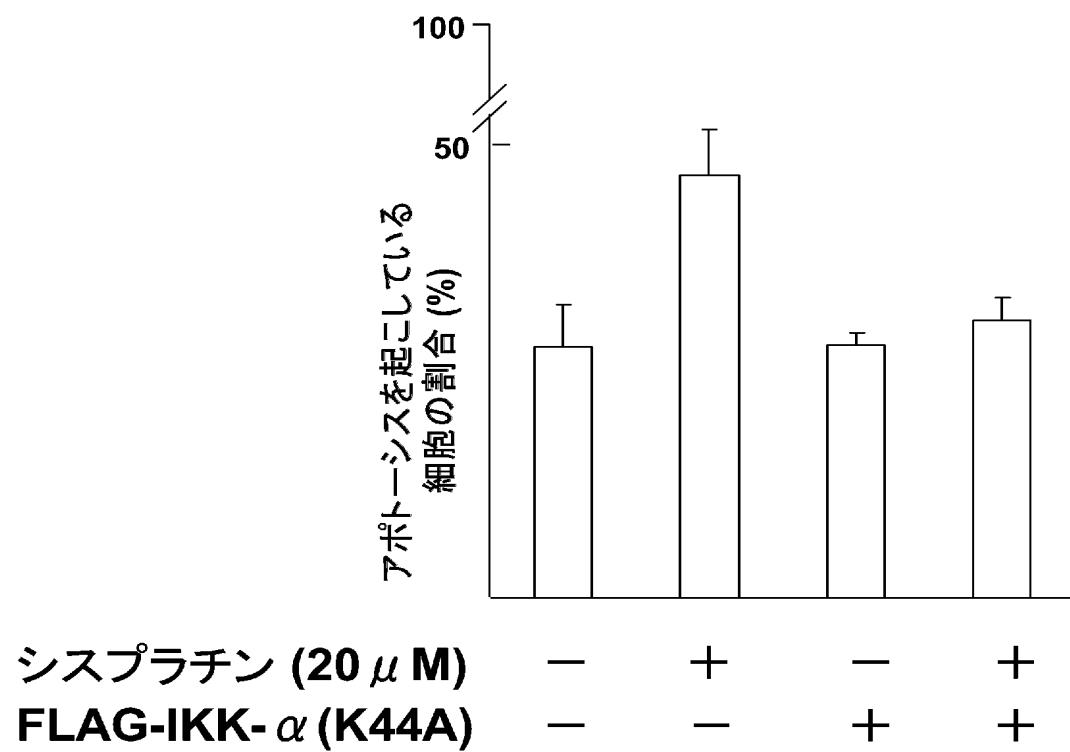
【図 3-1】



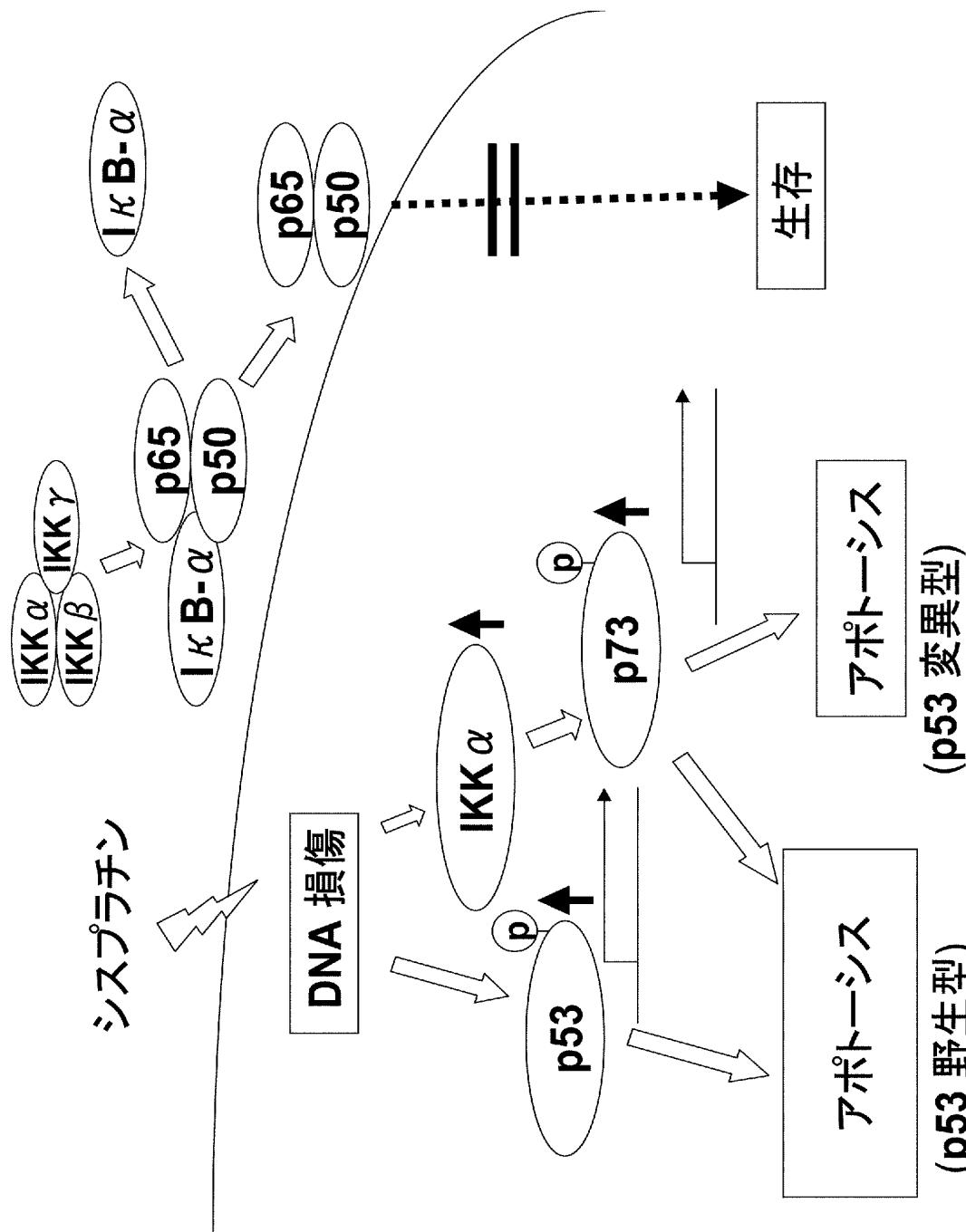
【図 3-2】



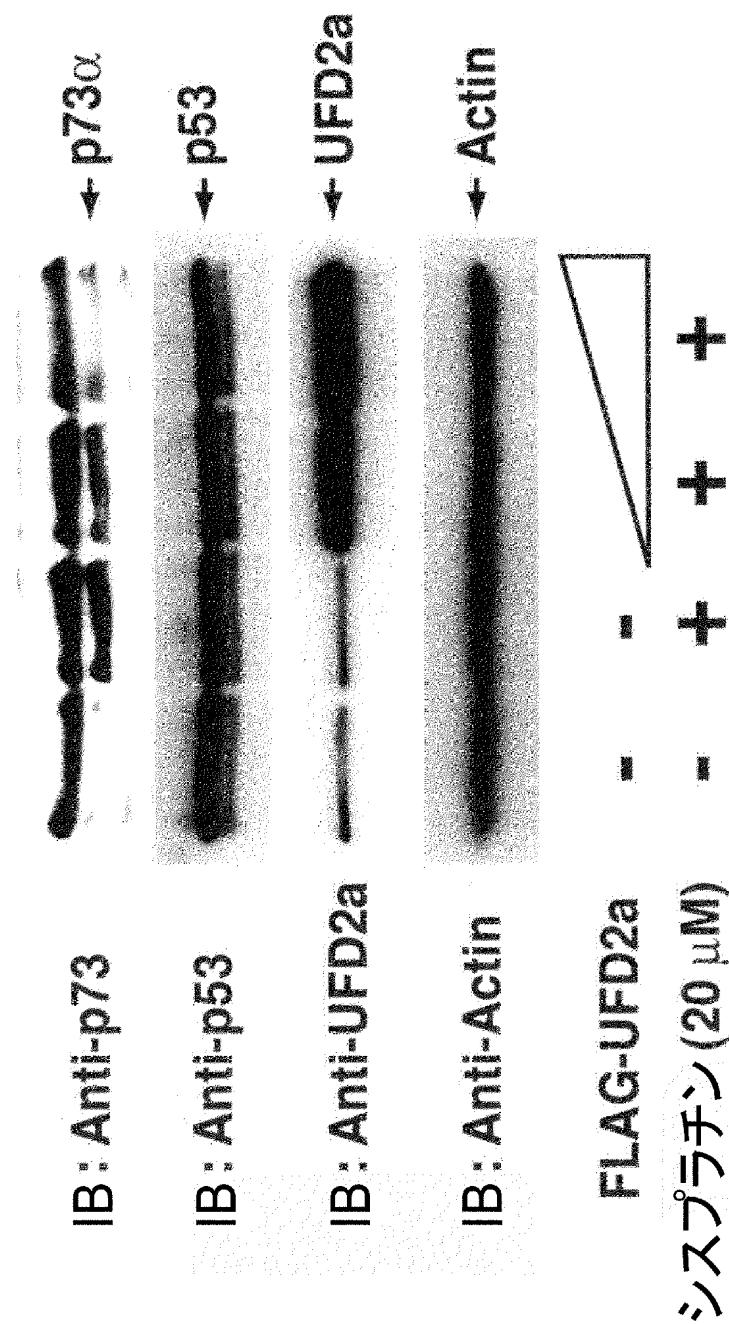
【図 3-3】



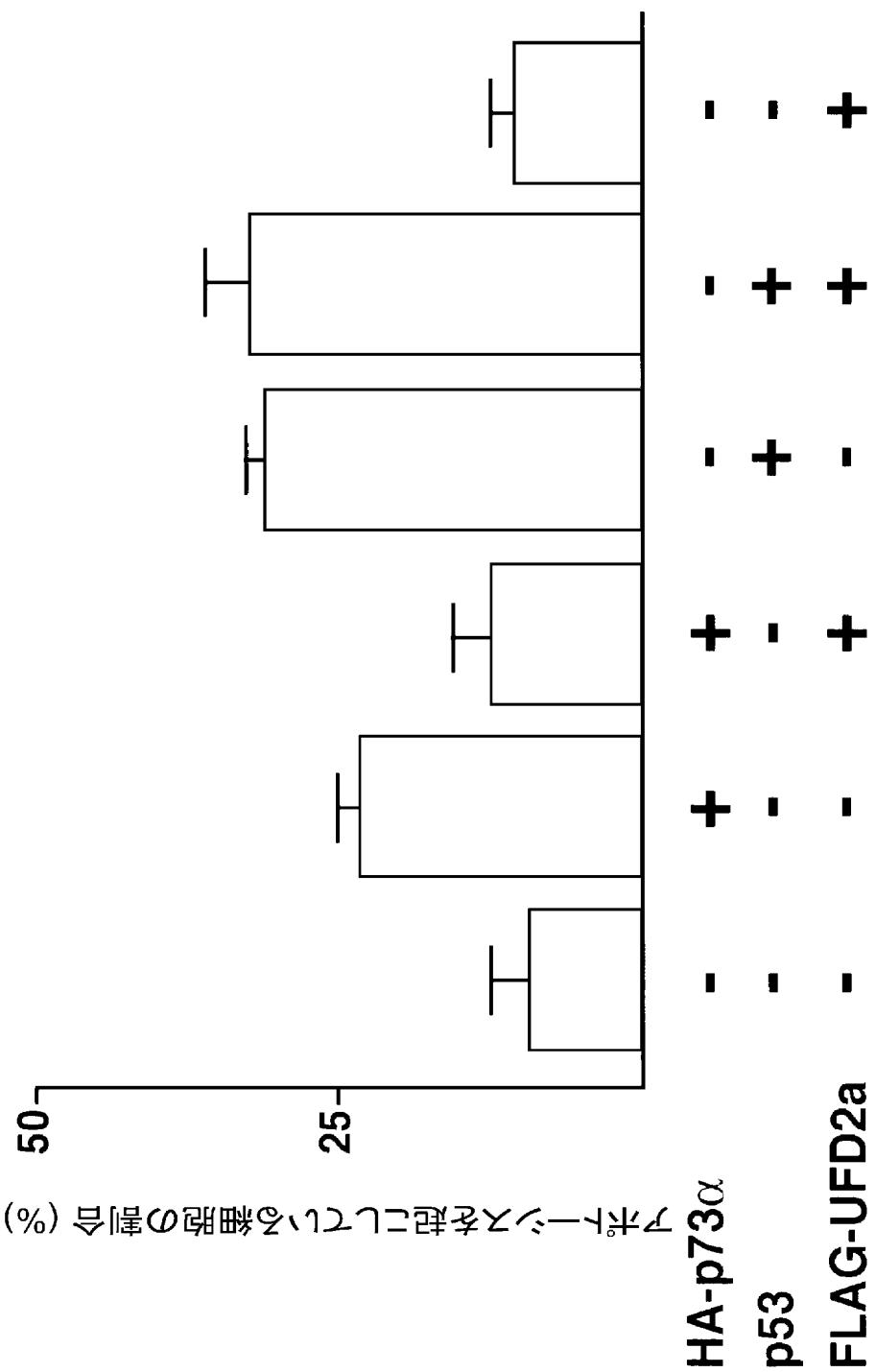
【図 3-4】



【図 3-5】



【図 3-6】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 p73 の活性化の分子メカニズムを解明し、そして、そのメカニズムから導き出されたアポトーシスを促進又は抑制する化合物のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 p73 と IKK- α との相互作用を増強する化合物を、アポトーシスを促進する化合物と判定する判定工程を備える、アポトーシスを促進する化合物のスクリーニング方法。

【選択図】 図34

【書類名】出願人名義変更届
【提出日】平成16年 7月14日
【あて先】特許庁長官 殿
【事件の表示】
　【出願番号】特願2004-176107
【承継人】
　【住所又は居所】千葉県千葉市中央区市場町1番1号
　【氏名又は名称】千葉県
【承継人代理人】
　【識別番号】100088155
　【弁理士】
　【氏名又は名称】長谷川 芳樹
【手数料の表示】
　【予納台帳番号】014708
　【納付金額】4,200円
【提出物件の目録】
　【物件名】承継人であることを証明する書面 1
　【援用の表示】平成16年7月14日付提出の特願2003-314345の出願人名義変更届に添付の譲渡証書
　【物件名】委任状 1
　【援用の表示】平成16年7月14日付提出の特願2003-314345の出願人名義変更届に添付の委任状

出願人履歴

0 0 0 1 6 0 5 2 2

19900913

新規登録

佐賀県鳥栖市田代大官町408番地

久光製薬株式会社

5 9 1 0 1 4 7 1 0

19920904

住所変更

5 9 2 0 7 7 6 7 1

千葉県千葉市中央区市場町1番1号

千葉県